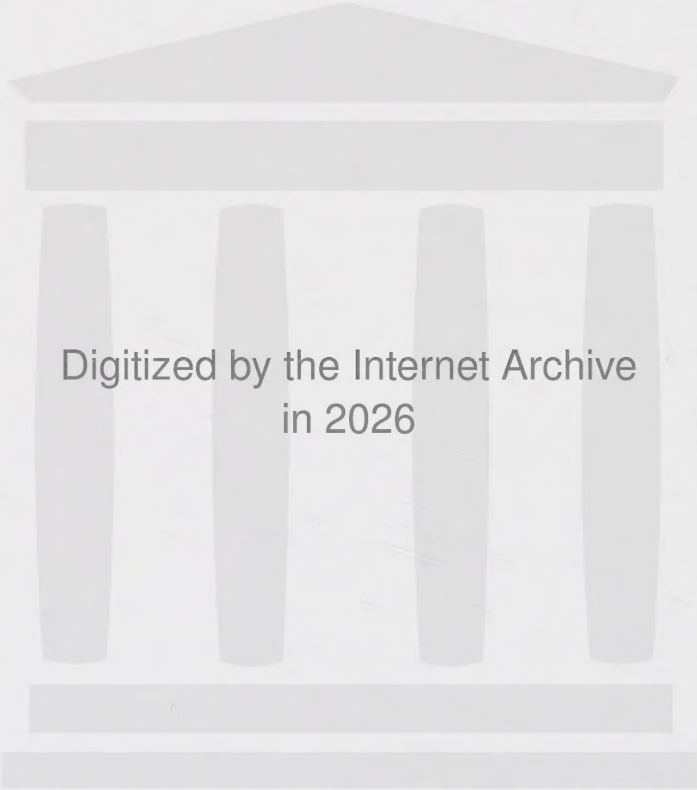


Untersuchungen zum Makrophagengehalt
von verschiedenen isogenen transplantablen
Tumorsystemen der C3H-Maus
vor und nach Bestrahlung

Roland Guttenberger

*Diss
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0038

Aus dem
Strahlenbiologischen Institut der Universität München
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. G. Riethmüller

Untersuchungen zum Makrophagengehalt von verschiedenen
isogenen transplantablen Tumorsystemen der C3H-Maus
vor und nach Bestrahlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Roland Guttenberger
aus
Bad Reichenhall
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K.R. Trott

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Riethmüller

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 1.1986

Meinen Eltern gewidmet

Das Thema der Dissertation wurde mir von Herrn Prof. Dr. K. R. Trott überlassen. Seiner vielfältigen Unterstützung gilt mein besonderer Dank. Für den Arbeitsplatz am Gefriermikrotom danke ich Herrn Prof. Dr. G. Riethmüller.

Die ungezählten Diskussionen mit Herrn Dr. J. P. Buschmann waren eine große Hilfe. Die kameradschaftliche Art, mit der er und Dr. W. Ziegler ihren Rat zur Verfügung stellten, verdient eigens hervorgehoben zu werden.

Frl. Pfeifer sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Strahlenbiologie sowie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Brück von der Firma Leitz für seine freundliche Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Methoden und Material	2
2.1.	Darstellung der Makrophagen	2
2.1.1.	Vorversuche mit Ruß	2
2.1.2.	Enzymhistochemischer Nachweis	3
2.2.	Versuchstiere	5
2.3.	Tumoren	5
2.4.	Transplantation	6
2.5.	Messung der Tumorgroße	7
2.6.	Röntgenbestrahlung	7
2.7.	Versuchsplan	7
2.8.	Auswertung	8
2.9.	Fehlerquellen und Reproduzierbarkeit	11
2.10.	Modellrechnung	14
3.	Ergebnisse	19
3.1.	Klinische Reaktion der Tumoren auf Bestrahlung	19
3.2.	Histologie der Tumoren nach Bestrahlung	21
3.3.	Enzymaktivität vor und nach Bestrahlung	26
3.3.1.	Zahl der Makrophagen	26
3.3.2.	Absolute enzymaktive Fläche	28
3.3.3.	Relative enzymaktive Fläche	30
3.3.4.	Änderung des Tumolvolumens und des Makrophagen- gehalts im Vergleich	32
3.4.	Ergebnis der photometrischen Messung	33
4.	Diskussion	34
5.	Zusammenfassung	39
6.	Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

Seit Jahrzehnten hat die kurative und palliative Bestrahlung von Tumoren einen festen Platz in den verschiedenen Schemata der Krebstherapie. Besonders beeindruckend für den klinisch tätigen Arzt ist der rasche Volumenverlust, den die Strahlentherapie bei Tumoren häufig bewirkt. Untersuchungen der letzten Jahre (59) zeigten, daß sich daraus für Tumoren mit mäßiger Immunogenität ein prognostischer Index bilden läßt. Bei nicht oder nur schwach immunogenen Tumoren jedoch hat der Schrumpfungsprozeß keinen prognostischen Wert. Die Vorgänge, die im bestrahlten Gewebe den Volumenverlust bedingen, sind letztlich noch nicht bekannt. Drei Möglichkeiten kommen grundsätzlich in Betracht: 1. Die beobachtete Schrumpfung beruht im wesentlichen auf Wasserverlust. 2. Die irreversibel geschädigten Zellen werden autolysiert. Der verflüssigte Detritus verläßt mit dem Saftstrom das Gewebe. 3. Makrophagen phagozytieren die absterbenden Zellen.

Von JUNG et al. (27) wird berichtet, daß im R1H Rhabdomyosarkom der Ratte 8 bis 10 Tage nach Bestrahlung die Anzahl der diploiden, d.h. Wirts-Zellen, um Faktor 10 zugenommen hat und damit 95 % der Zellen im Tumor stellt. Nach Bestrahlung wurden in Zellsuspensionen des LEWIS Lungenkarzinoms über mehrere Tage etwa 60 % Wirtszellen festgestellt (56). Vor Bestrahlung waren es lediglich 10 %, davon etwa die Hälfte Makrophagen, bzw. Monozyten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Makrophagengehalt von drei transplantablen Tumorsystemen vor und nach Bestrahlung zu untersuchen und die Rolle der Makrophagen für die klinisch beobachtete Reaktion der Tumoren auf Bestrahlung zu bestimmen.

2. Methoden und Material

2.1. Darstellung der Makrophagen

2.1.1. Vorversuche mit Ruß

Der Versuch, Makrophagen durch i. v. Injektion von Ruß (Degussa Flammruß 101, pH = 7, suspendiert in Hydroxy-Äthyl-Stärke, 2g/100ml) zu markieren, ergab keine befriedigenden Ergebnisse. Noch während der langsam gegebenen Injektion (Dauer ca. 30 sec) war eine plötzlich einsetzende, etwas dunklere Färbung der Pfoten des Tieres zu beobachten. Etwa 30 min nach der Verabreichung von 0,1 ml der kolloidalen Lösung in eine dorsale Schwanzvene zeigten Milz und Leber makroskopisch eine homogene, fast schwarze Verfärbung, die Lunge hingegen blieb frei. Im (unbehandelten) Tumor fanden sich mikroskopisch auch nach mehr als 2 h keine Kohlenstoffpartikel. Im Differentialblutbild konnten noch nach 2 h einige Zellen, wahrscheinlich Monozyten, mit phagozytierten Partikeln nachgewiesen werden. Auch freie Rußpartikel waren in geringer Anzahl vorhanden, ob noch nicht phagozytiert oder beim Ausstreichen wieder freigesetzt, konnte nicht entschieden werden. Nach 4 h konnte im peripheren Blutbild kein Ruß mehr festgestellt werden. Der Flammruß enthielt Teilchen mit einem Durchmesser zwischen 40 und 250 nm (Mittelwert: 110-120 nm, Median: ca. 80 nm), die nach tagelangem Rühren mit Magnetkern und Glaskugeln und anschließendem Filtrieren aus mikroskopisch kleinen Aggregaten (Durchmesser ca. 3µm) bestanden. Aber auch die kleinsten Kohlenstoffpartikel (4 nm) können normales Kapillarendothel nicht passieren (Interzellularspalten: ca. 3 nm) (34). Die Beobachtung, daß Milz und Leber die Partikel quantitativ aufnehmen, läßt zwei Deutungen zu: Entweder verbleibt bei jeder Milz- bzw. Leberpassage ein Teil der Fremdkörper im dortigen RES oder die Monozyten/Makrophagen werden dort zurückgehalten, sobald sie Ruß phagozytiert haben. Nachdem Makrophagen "postphagozytär" vor allem in den Lungenkapillaren hängen bleiben (34), halten wir die erstgenannte Möglichkeit für die wahrscheinlichere. Dabei bleibt unklar, inwieweit die Beladung des RES mit Kohlenstoffpartikeln die Interaktion von Tumor-

zellen und Makrophagen beeinflusst. Dies und die folgende Beobachtung von OTU et al. ließ uns einen anderen Weg beschreiten. Bei Experimenten an Mäusen ist nämlich die Clearance von zirkulierendem, kolloidalem Kohlenstoff während verschiedener Phasen des Tumorstadiums stark vermindert, wie OTU et al. (43) für das LEWIS Lungenkarzinom zeigten. Dieser Effekt konnte durch eine einzige Injektion von Serum einer Tumormaus auf eine gesunde syngenetische Maus übertragen werden. Der Autor zitiert eine Reihe von übereinstimmenden Arbeiten von STERN, FAUVE, NORTH, BOETCHER und LEONHARD, SNYDERMAN und PIKE. Wir untersuchten mikroskopische Schnitte von kleinen Tumorscheibchen, die direkt nach Entnahme in obiger Rußsuspension bei 37°C für einige Stunden inkubiert, mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und in Akrylat eingebettet worden waren. In den 4µm dicken Schnitten fanden sich besonders in kleinen Gewebsspalten der Randbereiche große Mengen der Rußsuspension, die offenbar spontan verklumpt war. Bei den Kohlenstoffklümpchen im Gewebe konnte also nicht a priori davon ausgegangen werden, daß sie intrazellulär liegen. Dies wäre jedoch für eine sichere lichtmikroskopische Differenzierung wünschenswert. Trotz dieser Einschränkung gewannen wir den Eindruck, als ob nur gelegentlich Phagozytose stattgefunden haben könnte. Das könnte den in-vitro-Bedingungen zuzuschreiben sein, könnte aber auch bestätigen, daß (in vitro) Makrophagen in der Nachbarschaft von Tumorzellen verminderte oder aufgehobene Pseudopodienbildung zeigen und kein phagozytisiertes Material enthalten (20). An gleicher Stelle (20) wird darauf hingewiesen, daß dies von Tumor zu Tumor unterschiedlich ist. Da Versuche zur Kohlenstoffphagozytose keine verwertbaren Ergebnisse zeitigten, wurde eine enzymhistochemische Methode verwendet.

2.1.2. Enzymhistochemischer Nachweis der Makrophagen

Die Fähigkeit zur Phagozytose geht mit einem außerordentlich hohen Gehalt an Lysosomen einher. Das lysosomale Leitenzym (6;15;49), die saure Phosphatase, wurde im weiteren für den Makrophagennachweis benutzt. Mit einer enzymhistochemischen

Technik lassen sich Stellen mit Saurer-Phosphatase-Aktivität mit einem roten Azofarbstoff anfärben. Dieser Nachweis wurde unter anderen von LAUDER (32) benutzt. Er geht davon aus, daß saure-Phosphatase-positive Zellen im wesentlichen Makrophagen sind. Im folgenden werden die Begriffe "enzym-aktive Stelle" und "Makrophage" synonym verwendet. Wir verstehen Makrophagen als Sammelbegriff für Monozyten (Blutmakrophagen) und Histiozyten (Gewebemakrophagen). Es ist bislang nicht geklärt, woher sich der Makrophagengehalt von Tumoren rekrutiert (53;58), wenn auch neuere Arbeiten (5;40; 48;55;56) die Monozyten als den wesentlichen Faktor wahrscheinlich machen.

Nachdem die saure Phosphatase ein nicht membrangebundenes Enzym ist, erfolgte zur Fixierung in den Lysosomen eine Vorbehandlung des Gewebes nach LOJDA (35) mit einer wässrigen Lösung (pH 7,3) von 4 % säurefreiem Formalin und 1 % CaCl_2 . Dazu wurde das Gewebe unmittelbar nach dem Wiegen in vorgekühlten Gefäßen für 24 h bei 4°C aufbewahrt. Tumoren über 250 mg wurden zuvor halbiert. Das Volumenverhältnis Fixationsmittel zu Gewebe betrug mindestens 20 : 1. Die Lösung wurde nicht gewechselt. Zur Erhöhung der Restaktivität und zur Vermeidung von Schäden durch zu langes Fixieren wurde das Gewebe nach der Fixation in 10 %ige Rohrzuckerlösung eingelegt. Auch hier betrug das Volumenverhältnis mindestens 20 : 1, die Lösung wurde nicht gewechselt, Aufbewahrungstemperatur war 4°C. Die Weiterverarbeitung erfolgte frühestens nach 24 h. Die Restaktivität der so behandelten sauren Phosphatase genügt für den enzymhistochemischen Nachweis von Zellen mit hoher Saure-Phosphatase-Aktivität.

Die Gewebeproben wurden auf den Objekttrisch eines Gefriermikrotoms gebracht und bei -20°C durchgefroren. Anschließend bedeckten wir sie mit einem Tropfen Wasser und nach nochmaligem Durchfrieren konnten 6 µm dicke Schnitte gefertigt werden. Nach Antauen an Objektträger erfolgte Lufttrocknung für 1 - 2 h bei Zimmertemperatur. Frieren und wieder Auftauen führt zu maximaler Aktivität der Hydrolasen (12;35;50) und damit auch der sauren Phosphatase.

Um die Aktivität dieses Enzyms nachzuweisen mischten wir

salzsaures 4 %iges p-Rosanilin und 4 %iges wässrige NaNO_2 -Lösung (je 100 μl). Nach abgelaufener Hexazotierung zeigt die Lösung ein klares Gelb. Erst dann wurde sie mit 30 ml 0,1 molarem Michaelispuffer (pH 7,62) verdünnt und der pH mit 2n HCl auf 5,3 eingestellt. 10 mg Naphthol-AS-BiPhosphat wurden in 1 ml Dimethylformamid (Merck) gelöst und hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde filtriert und vorgekühlt, die Schnitte dann bei 4°C für 12 h darin gefärbt. Danach sind enzymaktive Stellen rot gefärbt. Um die Reaktion zu stoppen und die entstandenen kleinen Gasbläschen von den Schnitten abzulösen wurden die Präparate bei Zimmertemperatur für einige Stunden in die oben beschriebene Formalinlösung eingestellt. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun (5 min), kurzem Eintauchen in Kalialaun (5 %) und 10 min "blauen" in Brunnenwasser.

Dehydrieren: Um die Verweildauer in Xylol möglichst kurz zu halten (hier wird etwas Azofarbstoff aus dem Schnitt herausgelöst), wurde jeder Objektträger einzeln entwässert und in Eukitt (Fa. O. Kindler) eingedeckt.

Zu Vergleichszwecken wurden einige Präparate in Glyzerin-gelatine eingebettet. Hierbei entfällt das Dehydrieren und die Azofarben bleiben noch besser erhalten, was aber keinen wesentlichen Vorteil bedeutet. Gegenfärbung der Kerne mit Methylgrün ergibt einen schönen Kontrast für die Schwarz-weißfotografie, aber die Intensität der Färbung unterliegt starken Schwankungen.

2.2. Versuchstiere

Verwendet wurden weibliche Mäuse vom Stamm C3H und von Hybriden (C3H x 101). Das Alter am Tag der Transplantation war 9 bis 11 Wochen (C3H) bzw. 5 Monate (C3H x 101). Sie erhielten Standardfutter Altromin und Wasser ad libitum.

2.3. Tumoren

Bei den verwendeten Tumoren handelt es sich um:

1) ein Fibrosarkom (SSK II), das unter wiederholter Hautpinselung mit Methylcholanthren auf der C3H Maus entstanden war. Nach etwa 20 Tierpassagen wurde der Tumor in Zell-

kultur gebracht und als monoklonales transplantables Tumorsystem weiterverwandt. Nach einigen Tierpassagen wurde der Tumor tiefgefroren. Von diesem Depot leiten sich alle weiteren Passagen ab. Histologisch handelt es sich um ein zellreiches, spindelzelliges Fibrosarkom mit faszikulär verwobener Struktur und geringer Faserbildung. Mit Trypsin erstellte Einzelzellsuspensionen bestehen flußzytometrisch zu 16 - 19 % aus euploiden Zellen (Kernfärbung mit Ethidiumbromid) (9).

ii) Ein undifferenziertes Mammarkarzinom (AT 7), histologisch ein Adenokarzinom mit starker Tendenz zu spontanen Einzelzellnekrosen, das im Strahlenfeld einer kurativ bestrahlten C3H Maus entstanden war und nach sieben Tierpassagen tiefgefroren wurde. Die Flußzytometrie (9) ergab einen Gehalt an euploiden Zellen von 25 - 33 %.

iii) Ein Osteosarkom (TVC), das in Mäusehybriden (C3H x 101) nach Inkorporation von Ra-226 entstanden ist. Unter dem Mikroskop zeigte sich ein stark heterogenes Bild mit verschiedensten Zelltypen, wobei mehrkernige Riesenzellen besonders auffallend waren. Diese hatten keine Saure-Phosphatase-Aktivität.

2.4. Transplantation

Der Tumor einer unbehandelten Maus wurde bei einem Durchmesser von ca. 10 mm entnommen, von Kapselgewebe befreit und mit einer Rasierklinge in Würfel von ca. 1 mm Kantenlänge zerteilt, wobei nekrotisches Gewebe - soweit erkennbar - verworfen wurde. Die vitalen Tumorstückchen wurden in physiologischer Kochsalzlösung für die unmittelbar anschließende Transplantation aufbewahrt. Unter Äthernarkose wurde in die rasierte Flanke des Empfängertieres ein Hautschnitt gesetzt, durch den eine Hohlneedle eingeführt wurde, die jeweils ein Tumorstückchen enthielt. Mit einem Trokar wurde der Tumor möglichst in der Mitte der Flanke subkutan deponiert, wobei der Abstand zum Hautschnitt mindestens 1 cm betrug, um eine vom Tumorstückchen ungestörte Wundheilung zu garantieren. Der Prozentsatz erfolgreicher Transplantate lag bei allen Tumoren über 80 %. Spontanremissionen der Tumoren

traten nicht auf.

2.5. Messung der Tumorgröße

Das Wachstum der Tumoren wurde durch externe Größenmessung verfolgt. Hierzu diente eine Lochschablone, wobei jeder Bohrung ein definiertes Tumorgewicht zugeordnet war. Umfangreiche Kalibrierungsmessungen dazu lagen bereits vor. Um eine weitgehend homogene Versuchsgruppe zu gewährleisten, mußten die Tumoren für die Weiterverwendung im Versuch folgende Bedingungen erfüllen: Sie durften nur solitär wachsen und im Verlauf des Versuchs nicht ulzerieren, was etwa von 90 % der Tumoren erfüllt wurde. Das Tumorgewicht bei Bestrahlung belief sich auf (s. Tab. 1):

Tab. 1	Wachstumszeit (Tage)	Gewicht bei Bestrah- lung (mg)	Verdopplungszeit bei ei- nem Gewicht von 100 mg (Tage)
SSK II	14 - 22	170 - 290	1,5
AT 7	19 - 34	86 - 107	2,5
TVC	18 - 27	ca. 240	1,5

Die Gewichtsangaben entstammen der Wägung der Kontrolltumoren.

2.6. Röntgenbestrahlung:

Unter Epontolnarkose (C3H 250 mg i.p., Hybriden 300 mg i.p.) wurden die Tumoren mit einer Dosis von 15 Gy bestrahlt (220 kV, Dosisleistung ca. 2 Gy/min, 1 mm Cu-Filter). Der Körper der Tiere wurde durch eine auf ca. 35°C vorgewärmte, 1 cm dicke Bleiröhre abgeschirmt (direkte Ganzkörperbestrahlung $<0,0005\text{Gy}$) und war demnach im wesentlichen nur durch die Streustrahlung aus dem Tumor belastet. Die im Umfeld des Tumors liegende Körperwand lag ebenfalls im direkten Strahlengang.

2.7. Versuchsplan

Die Entnahme der bestrahlten Tumoren erfolgte zeitlich gestaffelt (s. Tab. 2). Um der - sowohl zeitlich als auch quantitativ differierenden - Reaktion der Tumoren nach

Bestrahlung (s. auch 3.1.) Rechnung zu tragen, wurden in den Perioden mit raschem Volumenverlust die Tumoren in kürzeren Intervallen entnommen. So war beim AT 7 der erste Tag nach Bestrahlung von besonderem Interesse, während beim SSK II am 4. Tag ein "pool" von 4 Tumoren gebildet wurde.

Tab. 2	Zeitspanne zwischen Bestrahlung und Entnahme							
AT 7	5 min	2 h	8 h	24 h	4 d	8 d	18 d	
		1 h	4 h	16 h	50 h	6 d	11 d	
SSK II	8 h	16 h	24 h	2 d	3 d	4 d (4 x)	5 d	6 d 8 d 11 d
TVC	8 h	24 h	4 d	7 d				

Als Kontrolle dienten die Tumoren, die gerade zwischen zwei Bestrahlungsterminen das Ausgangsgewicht erreichten. Nach übereinstimmenden Berichten (14;16;21;39;41;47;62) ist der Makrophagengehalt eine tumorspezifische Größe und nicht von der jeweiligen Wachstumsdauer abhängig. Deshalb erschien es unbedenklich, die als Kontrolle dienenden Tumoren nicht randomisiert zu entnehmen. Ein besonders schnell wachsender Tumor (AT 7) wurde nicht in den Versuch genommen, weil er am 20. Tag bereits ein Gewicht von 210 mg erreicht hatte. Sein Makrophagengehalt entsprach dem der Kontrolltumoren, was uns in unserer obigen Annahme bestätigte.

Bei der Entnahme wurde Haut oder Peritoneum - falls fest mit dem Tumor verwachsen - am Tumor belassen. Die Milz wurde als retikuloendotheliales Referenzgewebe entnommen.

2.8. Auswertung

Bei 400-facher Vergrößerung wurden im Zeichenmikroskop entlang einer Linie durch das gesamte Präparat alle Zellkerne und Makrophagen gezählt, die diese zumindest berührten; desgleichen an einer weiteren, zur ersten senkrecht stehenden Linie. Um gezählt zu werden, mußten Makrophagen größer als die umliegenden Kerne sein. Nekrotische Zellkerne gelangten nicht in die Zählung, sobald sie keine scharfe Begrenzung mehr aufwiesen. Schmale Randzonen, die in ihrer Enzymaktivi-

tät stark vom übrigen Tumor abweichen, wurden nicht mitgezählt, sondern eigens beschrieben. Der Umriss des Präparates und die genaue Lage der Zähl-Linien wurden mittels eines Zeichenmikroskopes festgehalten.

Für die halbautomatische Bildanalyse stand das System ELAS der Firma Leitz mit dem Computerprogramm Uni 2000 zur Verfügung. Es ist im Prinzip ein Zeichenmikroskop, d. h. der Betrachter sieht zusätzlich zum Präparat eine neben dem Mikroskop liegende Ebene (z.B. Zeichenfläche) eingeblendet. In diese Ebene wird eine magnetische Sensorplatte eingebracht, so daß ein Leuchtdioden-Cursor einerseits im Mikroskop - scheinbar im Präparat - zu sehen ist, andererseits Koordinaten an einen Rechner abgeben kann. Werden mit dem Lichtpunkt die Umrisse einer Fläche nachgezeichnet, errechnet der Computer daraus ihre Größe. Dazu ist es notwendig den Ausgangspunkt innerhalb kleiner Toleranzen wieder zu erreichen, d. h. die Linie zu schließen. An jedem anderen Punkt der Meßlinie darf sie sich überkreuzen. Sowie der Cursor den Toleranzbereich berührt, schließt der Computer den Linienzug automatisch mit einer Geraden. Daraus folgt: Beginnt die Messung an einer annähernd geraden Stelle des Umrisses, macht diese Vereinfachung praktisch keinen Fehler. In jedem Fall bleibt der diesbezügliche Fehler deutlich unter einem Prozent, je nachdem wie der Kontrollradius gewählt wird. Vor Beginn einer Meßreihe wurde das System geeicht.

Wir erhielten in einem Arbeitsgang drei Informationen:

- i) Anzahl der Makrophagen pro Zählfeld
- ii) (absolute) Fläche der einzelnen Makrophagen
- iii) Summe der Flächen aller Makrophagen bezogen auf die Fläche des Zählfeldes

Die Größe des Zählfeldes wurde durch einen Okulareinsatz konstant gehalten. Die Messung eines Schnittes bestand aus dem Ergebnis von 5 ca. $22\,500\ (\mu\text{m})^2$ großen Zählfeldern. Lagen in einem dieser zufällig gewählten Felder oben beschriebene Randzonen oder größere Einrisse oder Falten des Schnittes, so wurde ein neues aufgesucht. Der Objektisch

wurde immer in der gleichen Richtung verstellt, so daß in jedem Fall eine neue Stelle des Präparates zur Auswertung kam. Nicht vollständig im Zählfeld liegende Makrophagen blieben an zwei Seiten unberücksichtigt, während ihre Flächen an den anderen Seiten als Ganzes in die Messung eingingen.

Zur photometrischen Messung der Dauerpräparate wurde von jedem der beiden verwendeten Farbstoffe ein Spektrogramm erstellt (s. Abb. 1). Ausgangspunkt war folgende Überlegung: Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz hängt die Extinktion einer Lösung bzw. eines Filters linear von der Konzentration des Farbstoffes und der Länge des Strahlenganges in diesem Farb-

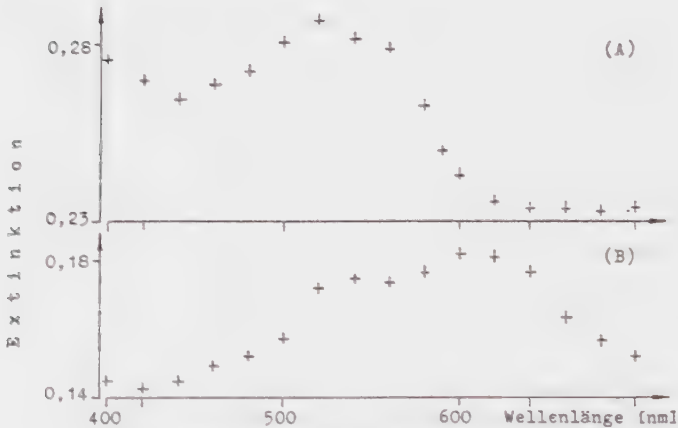


Abb. 1: Spektrogramme der Farbstoffe Pararosanilin (A) und Hämalan (B). Sie wurden an histologischen Schnitten erstellt, die jeweils nur den gemessenen Farbstoff enthielten.

stoff ab. Das gilt nur in einem Bereich, der durch Vorversuche zu bestimmen ist. Wenn der Farbstoff nicht gleichmäßig verteilt ist und ein Teil des Lichtbündels erfährt eine Extinktion von E_1 und der andere von E_2 , dann liegt das Meßergebnis zwischen E_1 und E_2 . Liegen nun die Makrophagen aufgrund ihrer kräftigen Färbung oberhalb des linearen Bereichs (was

anzunehmen ist), dann bewirken geringfügige Zu- oder Abnahmen der Farbstoffkonzentration oder der Schichtdicke so gut wie keine Extinktionsänderung. Die Menge des absorbierten Lichtes ist dann nur noch von der Fläche der Makrophagen bestimmt, deren Gesamtheit wir erfassen wollen. Vom allgemeinen Hintergrundrauschen, das nicht ausschließlich vom Makrophagengehalt abhängt, wird angenommen, daß es relativ gering ist und in den verschiedenen Schnitten in etwa gleich. Nachdem Stellen, die keine Extinktion bewirken (in unseren Schnitten z. B. Trocknungsartefakte), den Meßwert stark beeinflussen, wurde die Extinktion der Makrophagen auf die Extinktion der Zellkerne bezogen. Dabei fällt eine eventuell leicht schwankende Schichtdicke ebenso heraus wie Trocknungsartefakte. Leider ist die Kernfärbung nicht so konstant, daß Präparate aus verschiedenen Färbegängen miteinander verglichen werden können. Die Färbung der Makrophagen erschien unter dem Mikroskop konstant. Nachdem die Präparate eines Objektträgers praktisch die gleichen Färbbedingungen hatten, zeitigten ihre Meßwerte gute Übereinstimmung. Verschieden dicke Schnitte von Tumoren ergaben den gleichen Extinktionsquotienten. Randbereiche, die nicht nur aus Tumorgewebe bestehen, zeigte der Extinktionsquotient zuverlässig an.

Für exakt die selbe Stelle (ca. 3 mm^2) eines Präparates wurden die Extinktionen bei 420 und 640 nm gemessen (E_{420} und E_{640}), gleiches geschah mit einem leeren Präparat (Objektträger, Eukitt, Deckglas). Die Differenz der Extinktionen und der jeweiligen Nullwerte ergibt ΔE_{420} und ΔE_{640} . Die Quotienten $\Delta E_{420}/\Delta E_{640}$ der Präparate jeweils eines Objektträgers (gleiche Färbbedingungen) ermöglichten eine Aussage über die Makrophagendichte in verschiedenen Ebenen des Tumors.

2.9. Fehlerquellen und Reproduzierbarkeit

2.9.1. Zeichenmikroskop

Ob ein Zellkern die Zähl-Linie gerade noch berührt oder nicht, ist leicht zu entscheiden. Da Makrophagen keine so scharfen Umrisse zeigen wie Zellkerne, war hier obige Entscheidung manchmal schwierig. In Zweifelsfällen wurde der

Makrophage mitgezählt. Wegen des großen Durchmessers der Makrophagen stellte sich dieses Problem relativ selten. Der unterschiedliche Durchmesser der gezählten Objekte führt zu einem systematischen Fehler, da Makrophagen eines weiteren Umfeldes die Zähl-Linie eben noch berühren, als dies für Zellkerne der Fall ist. Es werden also die Makrophagen einer größeren Fläche auf die Zellkerne einer kleineren Fläche bezogen. Daraus folgt: Der mit dieser Methode ermittelte Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl liegt um einen, vom Verhältnis der Durchmesser abhängigen, Faktor zu hoch, was im Rahmen einer Verlaufsbeobachtung ohne Bedeutung ist, wenn es sich um einen konstanten Fehler handelt. Im Laufe unserer Auswertung mit der halbautomatischen Bildanalyse zeigte sich jedoch, daß die Größenverhältnisse nach Bestrahlung keineswegs konstant sind. In 2.10. soll versucht werden, anhand einer Modellrechnung die Größenordnung dieses Fehlers abzuschätzen. Die Reproduzierbarkeit beträgt $\pm 10 \%$.

2.9.2. Halbautomatische Bildanalyse

Diese Methode ist von etwaigen Größenänderungen der Makrophagen nur indirekt beeinflusst (s. 2.10.). Allerdings gehen Schwankungen der Schnittdicke als unbekannte Größe ein. Desweiteren können Gewebe mit unterschiedlicher Zelldichte nicht ohne weiteres verglichen werden. Soweit dem Auge des Beobachters ohne zusätzliche Messungen möglich, wurden diese Parameter konstant gehalten. Die Ergebnisse dieser Methode können in ihrem Zahlenwert natürlich nicht mit denen der obigen Methode übereinstimmen. So wird z.B. die Fläche der Makrophagen auf ein Meßfeld bezogen, in das die Interzellularspalten (in Tumoren größer als in gesundem Gewebe 24; 64) ebenso eingehen wie die (wahrscheinlich) ungefärbten Randzonen der Makrophagen, in denen sich bekanntlich keine Lysosomen befinden (15). Die unscharfe Begrenzung der Makrophagen stellte auch in dieser Auswertung ein Problem dar. Zur Abschätzung der Streuung wurde ein Makrophage zehnmal gemessen. Um Ermüdung und Konzentrationsabfall bei der Auswertung mit zu erfassen, wurden diese Messungen am Ende eines Arbeitstages am Bildanalysegerät durchgeführt. Dabei

wurde darauf geachtet, daß das Nachzeichnen des Makrophagen jeweils an einem anderen Punkt begonnen wurde und keine zusätzlichen Orientierungsmarken im umliegenden Gewebe benutzt wurden. So ergab sich ein Variationskoeffizient von 17. Um die Genauigkeit zu überprüfen, die mit der halbautomatischen Bildanalyse erreicht wird, wurde eine rechtwinkelige Fläche bekannter Größe zehnmal gemessen. Der Mittelwert lag 3 % unter dem tatsächlichen Wert, bei einem Variationskoeffizienten von 5. Das Arbeitstempo entsprach dem der routinemäßigen Auswertung. Indem man bei stärkerer Vergrößerung arbeitet, lassen sich bessere Ergebnisse erzielen, denn die Genauigkeit nimmt mit dem Sehinkel des gemessenen Objektes zu; z.B. beträgt die rechnerische Zunahme der Meßgenauigkeit (in Abhängigkeit von der Form) ungefähr $\sqrt{2}$, wenn sich die gemessene Fläche verdoppelt. Das Rechteck hatte etwa die 4,5-fache Fläche des Makrophagen.

Bei der Angabe der Reproduzierbarkeit der Werte muß zwischen den verschiedenen Meßgrößen unterschieden werden. Die relative Fläche der Makrophagen in Prozent der Gesamtfläche war mit einem Variationskoeffizienten von 10 gut reproduzierbar, d.h. es wurde bei ausreichender Vergrößerung gemessen. Die mittlere Fläche der Makrophagen unterlag größeren Schwankungen, ebenso die Anzahl der Makrophagen in den Zählfeldern. Die Schwankungen verhielten sich in etwa indirekt proportional zueinander. Die Schwierigkeit lag darin, zu entscheiden, ob nahe beieinanderliegende enzymaktive Stellen als ein Makrophage betrachtet werden sollten, oder ob es sich um verschiedene Zellen handelt. Um eine größenmäßige Vorstellung dieser Schwankungen zu erhalten, wurde an einem Präparat anhand zweier Messungen versucht, einmal möglichst wenige und damit große Makrophagen zu erzielen und einmal alle zweifelhaften Fälle zugunsten kleiner Makrophagen zu entscheiden. Die mittlere Fläche änderte sich dabei ungefähr um Faktor 2, während der relative Anteil der Makrophagen konstant blieb (-2 %). Unter Anlegung eines möglichst einheitlichen Maßstabes, erzielten wir einen Variationskoeffizienten von 20. Nachdem die mittlere Größe der Makrophagen auch vom Färbe-

ansatz abhängen könnte, wurden die jeweils mitgefärbten Milzschnitte verglichen. Hier zeigte sich, daß ein Fehler unterhalb unserer Meßgenauigkeit liegen müßte. Dies kam auch darin zum Ausdruck, daß Schnitte mit stark unterschiedlicher Makrophagengröße aus ein und dem selben Färbeansatz stammten. Die mittlere Größe der Makrophagen wird auch von Schwankungen bei der Gewebepreparation nicht nachweisbar beeinflußt. So korrelierte das Gewicht der entnommenen Tumoren, das das genaue Verhältnis von Fixationsmittel- und Gewebesvolumen, sowie die Länge der Diffusionsstrecke bestimmte, nicht mit der gemessenen Makrophagengröße. Die Fixierung ebenso wie die Auswaschung laufen bei der sauren Phosphatase auf einen Endzustand hin (35). Dies gilt nicht für alle Enzyme und macht daher die saure Phosphatase besonders geeignet für enzymhistochemische Methoden.

2.9.3. Photometrische Messung

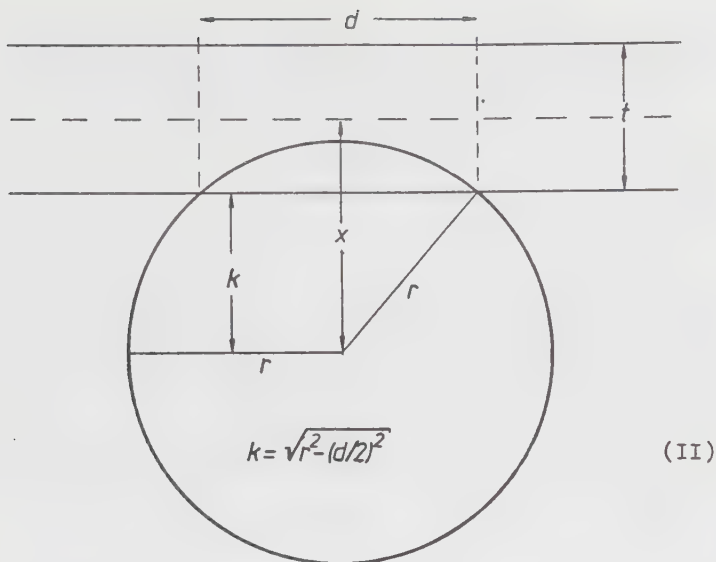
Nachdem der Lichtstrom einer Lampe bei verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich ist, wurde jeweils gegen Null gemessen. Völlig unabhängige Messungen mehrerer Präparate ergaben Variationskoeffizienten zwischen 1 und 5. Dabei wurde darauf geachtet, daß nur Tumorgewebe im Strahlengang lag.

2.10. Modellrechnung

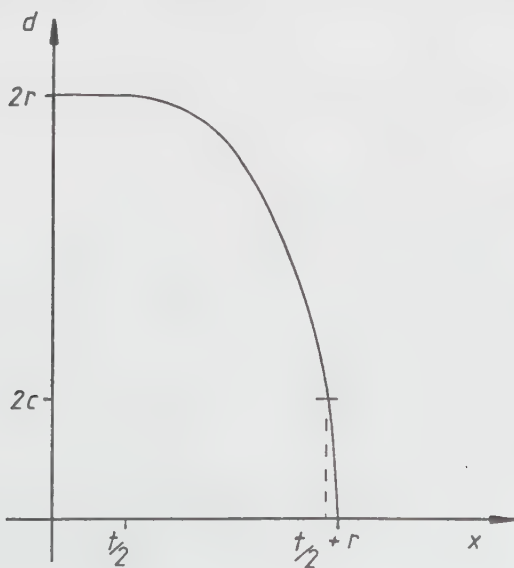
Im folgenden soll mit Hilfe eines vereinfachten Modells errechnet werden, wie verschiedene Meßwerte von der Größe der Makrophagen bzw. einer Änderung derselben abhängen.

Sei der mit unserer Färbung dargestellte Anteil des Makrophagen eine Kugel mit dem Radius r . Nennen wir den Abstand des Mittelpunkts des Makrophagen von einer gedachten Mittellinie des Gefrierschnittes x (betrachtet im Augenblick des Schneidens), so gilt für den Durchmesser d des Makrophagen, den wir in einem Gefrierschnitt der Dicke t sehen:

$$\begin{aligned}
 d &= 0 && \text{für} && x \geq t/2 + r \\
 d &= 2 \sqrt{r^2 - (x - t/2)^2} && \text{für} && t/2 < x < t/2 + r \\
 d &= 2r && \text{für} && 0 \leq x \leq t/2
 \end{aligned} \tag{I}$$



Der Zusammenhang von d und x lässt sich graphisch wie folgt darstellen:



Nachdem für x jeder Wert mit gleicher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, ergibt sich der mittlere Durchmesser m der Makrophagen in einem Schnitt aus dem Quotienten der Fläche unter der Kurve (d.h. dem Integral aller d von $x = 0$ bis $x = t/2 + r$) und $t/2 + r$.

$$m = \left(\int_0^{t/2+r} d \, dx \right) / (t/2 + r) \quad (\text{III})$$

Wird ein Makrophage nicht mehr als solcher erkannt, wenn für seinen Durchmesser gilt: $d < 2c$ (Enzymaktive Stellen mußten größer als ein Zellkern sein, um gezählt zu werden.), dann darf nur bis $t/2 + k$ integriert werden, mit

$$k = \sqrt{r^2 - c^2} \quad (\text{nach Gleichung (II)})$$

Also gilt:

$$m = \left(\int_0^{t/2+k} d \, dx \right) / (t/2 + k) = \left(\int_0^{t/2+\sqrt{r^2-c^2}} d \, dx \right) / (t/2 + \sqrt{r^2-c^2}) \quad (\text{mit (I)})$$

$$\begin{aligned} &= \left(\int_0^{t/2} 2r \, dx + \int_{t/2}^{t/2+\sqrt{r^2-c^2}} 2 \sqrt{r^2 - (x-t/2)^2} \, dx \right) / (t/2 + \sqrt{r^2-c^2}) \\ &= (rt + c \sqrt{r^2-c^2} + r^2 \arcsin \frac{1}{r} \sqrt{r^2-c^2}) / (t/2 + \sqrt{r^2-c^2}) \quad (\text{IIIa}) \end{aligned}$$

Für die mittlere Fläche a , die von den Makrophagen im Präparat zu sehen ist, gilt analog:

$$\begin{aligned} a &= \left(\int_0^{t/2+\sqrt{r^2-c^2}} \pi (d/2)^2 \, dx \right) / (t/2 + \sqrt{r^2-c^2}) \\ &= \left(\pi \int_0^{t/2} r^2 \, dx + \pi \int_{t/2}^{t/2+\sqrt{r^2-c^2}} (r^2 - (x-t/2)^2) \, dx \right) / (t/2 + \sqrt{r^2-c^2}) \\ &= (\pi r^2 t/2 + r^2 \pi \sqrt{r^2-c^2} - \frac{\pi}{3} \sqrt{r^2-c^2}^3) / (t/2 + \sqrt{r^2-c^2}) \quad (\text{IV}) \end{aligned}$$

Nimmt man für die Makrophagen einen Durchmesser von $15\text{ }\mu\text{m}$ an, so erhält man mit $t = 6\text{ }\mu\text{m}$ und $c = 2\text{ }\mu\text{m}$ unter Verwendung von (IIIa) einen mittleren Durchmesser der Makrophagen, wie sie im Präparat zu sehen sind: $m \sim 13\text{ }\mu\text{m}$.

Durch Einsetzen von (IV) ergibt sich für die mittlere Fläche: $a \sim 140\text{ }(\mu\text{m})^2$. Beträgt der Durchmesser der Makrophagen dagegen nur $12\text{ }\mu\text{m}$, so errechnen sich in völliger Analogie: $m \sim 10,6\text{ }\mu\text{m}$ und $a \sim 90\text{ }(\mu\text{m})^2$.

Ist die Anzahl an Makrophagen in einem Tumor N und das Volumen des Tumors V, dann ist durch $\frac{N}{V} = \varrho$ die Dichte der Makrophagen in dem Tumor bestimmt. Ein Schnitt der Dicke t und der Fläche A enthält Anschnitte mit der Schnittfläche $S > \pi c^2$ von den Makrophagen, deren Mittelpunkt in einem Volumen v liegt, für das unter Verwendung von (II) gilt:

$$v = A (t + 2 \sqrt{r^2 - c^2})$$

Nehmen wir nun an, die Dichte ϱ werde durch Bestrahlung nicht verändert, während der Radius r der Makrophagen auf r' zu- oder abgenommen hat, dann gilt für die Anzahl n bzw. n' der Makrophagen in einem Schnitt der Fläche A und der Dicke t:

$$n = \varrho v = \varrho A(t + 2 \sqrt{r^2 - c^2}); \quad n' = \varrho v' = \varrho A(t + 2 \sqrt{r'^2 - c^2})$$

$$\text{Es folgt: } n'/n = (t + 2 \sqrt{r'^2 - c^2}) / (t + 2 \sqrt{r^2 - c^2}) \quad (V)$$

Für den SSK II zeigte sich bei der zeichenmikroskopischen Auswertung eine Abnahme des Makrophagengehalts vom 2. auf den 3. Tag nach Bestrahlung. Stellten die Makrophagen am 2. Tag noch 8 % der gesamten Zellen, waren es am folgenden Tag lediglich 2 % (s. 3.3.1.). Vermutlich entspringt diese Abnahme nur etwa zur Hälfte einer tatsächlichen zahlenmäßigen Abnahme der Makrophagen. Der Rest ist ein Effekt der Größenabnahme der Makrophagen, wie sie mit der halbautomatischen Bildanalyse festzustellen war (s. 3.3.2.). Und zwar nahm der mittlere Radius der Makrophagen von $5\text{ }\mu\text{m}$ auf $4\text{ }\mu\text{m}$ ab. Mit der Schnittdicke $t = 6\text{ }\mu\text{m}$ und einem minimalen

Makrophagenradius (untere Erkennungsgrenze) von $c \approx 2 \mu\text{m}$ in Gleichung (V) eingesetzt, ergibt sich $n'/n = 0,85$ d.h. allein durch die Größenabnahme der Makrophagen werden in einem histologischen Schnitt gleicher Größe statt 100 nur 85 Makrophagen erfaßt. Noch einmal den selben Effekt erhält man bei Auswertung entlang einer Zähllinie. In unserem Beispiel werden am 2. Tag nach Bestrahlung die Makrophagen im Mittel noch in einer Entfernung von $5 \mu\text{m}$ von der Zähllinie erfaßt, am 3. Tag dagegen nur in einem mittleren Abstand von $4 \mu\text{m}$. Daraus resultiert eine weitere (scheinbare) Abnahme der Makrophagenzahl auf 80 % des Ausgangswerts. Nachdem sich diese Effekte multiplizieren, nimmt der Anteil der Makrophagen insgesamt scheinbar auf 68 % des Ausgangswerts ab, d.h. eine Abnahme des Makrophagenanteils von 8 % auf etwa 5,4 % ließe sich allein mit der gemessenen Größenabnahme der Makrophagen erklären. Dies muß bei der Beurteilung von histologischen Schnitten berücksichtigt werden, besonders wenn versucht wird, eine Aussage über die Kinetik von Zellen zu machen. Es gilt aber noch einen weiteren Effekt zu beachten, der sich vor allem beim AT 7 auswirkt. Nachdem Makrophagen durch Bestrahlung mit 15 Gy nicht letal geschädigt werden (13), müßte die Dichte ϱ bei Volumenverlust des Tumors zunehmen. Nimmt das Volumen V des Tumors auf den Wert V/s ab und bleibt die Zahl der Makrophagen im Tumor konstant, so gilt für die Dichte $\varrho'(s)$:

$$\varrho'(s) = s \frac{N}{V} = s\varrho \quad (\text{VI})$$

Die in einem Schnitt (gleichen Volumens) gefundene Anzahl an Makrophagen erhöht sich also um Faktor s . In 3.3.4. werden die anhand des Volumenverlustes der Tumoren zu erwartenden Werte den tatsächlich gemessenen Werten gegenübergestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Reaktion der Tumoren auf Bestrahlung

Die klinische Reaktion von 100 mg schweren Tumoren des Fibrosarkoms SSK II und des Mammakarzinoms AT 7 nach lokaler Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 15 Gy war aus umfangreichen Versuchen bekannt (31). Die Tumoren zeigen bei dem gewählten Ausgangsgewicht exponentielles Wachstum. Nach Bestrahlung mit 15 Gy stellt sich beim AT 7 eine Abnahme des Volumens ein, die am ersten Tag am steilsten verläuft und dann mehr und mehr abflacht (s. Abb. 2). Das Minimalgewicht (ca. 25 % des Ausgangswertes) wird zwischen dem 6. und dem 10. Tag nach Bestrahlung erreicht. In diesem

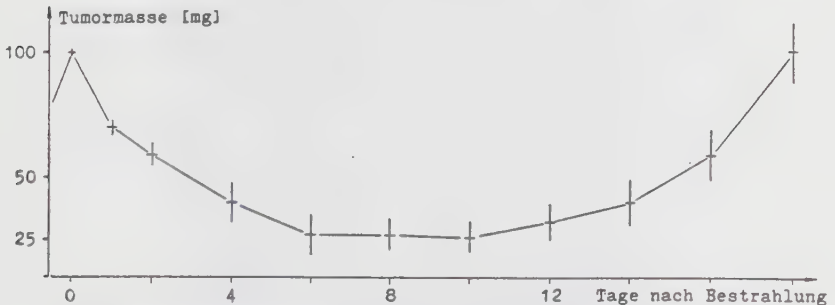


Abb. 2: Wachstumsverzögerung von 100 mg schweren Tumoren des Mammakarzinoms AT 7 nach lokaler Röntgenbestrahlung mit einer Einzeldosis von 15 Gy. Die Kurve stellt den mittleren Größenverlauf von 10 Tumoren dar. Nach KUMMERMEHR (31).

Intervall ändert sich das Tumorgewicht nur unwesentlich. Im folgenden beginnt der Tumor, erst langsam, dann immer schneller zu wachsen. Das Ausgangsgewicht wird etwa am 18. Tag wieder erreicht. Bis zu diesem Zeitpunkt erstreckte sich unser Beobachtungszeitraum.

Die Tumoren, die dieser Arbeit zugrunde liegen, zeigten eine gute Übereinstimmung mit dieser Kurve, mit folgenden Ausnahmen: Die Werte nach 4, 11 und 18 Tagen liegen über dem Tabellenwert. Nach 4 und nach 11 Tagen beträgt die Abweichung Faktor 4 bis 5, so daß bei der Interpretation dieser Werte Zurückhaltung geboten scheint. Der Tumor, den

wir 18 Tage nach Bestrahlung entnehmen, war mit der Haut verbacken. Dies und die lange Zeitspanne lassen uns eine Abweichung um Faktor 2 bis 3 als gangbar erscheinen.

Beim SSK II sistiert das Wachstum in den ersten beiden Tagen nach Bestrahlung mit 15 Gy. Dann setzt ein mäßiger Gewichtsverlust ein (s. Abb. 3), der etwa am 5. Tag mit Erreichen des Minimalgewichtes (ca. 85 % des Ausgangswerts) endet. Der Tumor beginnt dann wieder zu wachsen und erreicht das Ausgangsgewicht am 7. Tag. Der Beobachtungszeitraum erstreckt sich bis zum 11. Tag, wo das Doppelte des Ausgangsgewichtes annähernd erreicht ist.

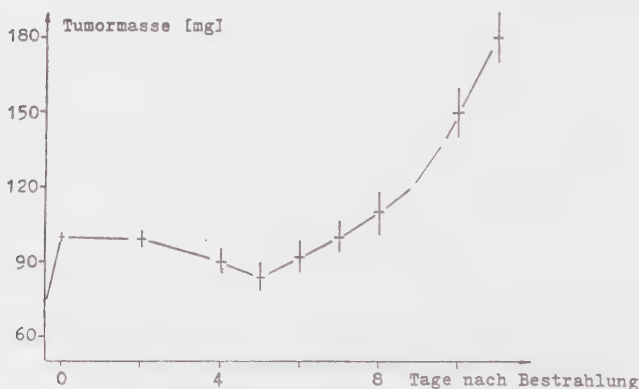


Abb.3: Wachstumsverzögerung von 100 mg schweren Tumoren des Fibrosarkoms SSK II nach lokaler Röntgenbestrahlung mit einer Einzeldosis von 15 Gy. Die Kurve stellt den mittleren Größenverlauf von 10 Tumoren dar. Nach KUMMERMEHR (31).

Bei den Tumoren des SSK II im Versuch fiel auf, daß der nach 8 Tagen entnommene Tumor (850 mg) deutlich schwerer ist als der nach 11 Tagen (500 mg). Bei beiden mußte indes etwas von dem umliegenden Gewebe am Tumor belassen werden.

Das Osteosarkom TVC zeigt nach Bestrahlung mit 15 Gy keinen Volumenverlust. Das doppelte Ausgangsgewicht wird nach unseren Messungen zwischen dem 3. und 5. Tag nach Bestrahlung erlangt.

3.2. Histologie der Tumoren nach Bestrahlung

Mit der von uns verwendeten Färbung ließ sich folgendes feststellen:

1. Die als Referenzgewebe gefärbte Milz zeigte in den bereits makroskopisch gut sichtbaren Malpighischen Körperchen nur gelegentlich Makrophagen. Lymphozyten/-blasten hatten keine Enzymaktivität. Die rote Pulpa bestand im wesentlichen aus stark enzymaktiven Zellen (Makrophagen) (s. Abb. 4).



Abb. 4: Gefrierschnitt (6 μ m) der Milz einer C3H - Maus, Saure-Phosphatase-Färbung mit Pararosanilin, mod. n. LOJDA (35), Kernfärbung mit Hämalaun, wie in 2.1.1. geschildert. Makrophagen (Pfeile) sind als große intensiv rote Punkte dargestellt. Die Milz wurde als Kontrollgewebe jeweils mitgefärbt. Gesamtvergrößerung ca. 65-fach.

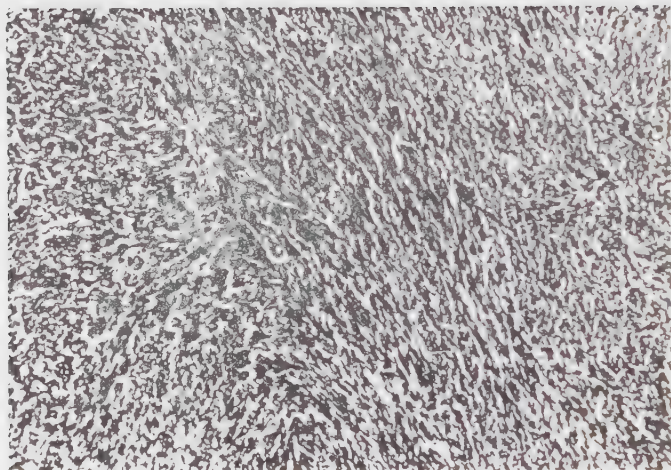


Abb. 5: Fibrosarkom SSK II der C3H-Maus, 4 Tage nach Bestrahlung mit einer lokalen Einzeldosis von 15 Gy. Histologische Methodik wie in Anmerkung zu Abb. 4. Gesamtvergrößerung ca. 100-fach.

Lediglich im umgebenden Bindegewebe finden sich Makrophagen (Pfeile). Die halbautomatische Bildanalyse des Tumorgewebes (s. 2.8.) ergab einen Makrophagenanteil von 0,7 %. Dies war der niedrigste Wert aus allen Meßreihen. Ein ähnlicher Makrophagengehalt des umliegenden Bindegewebes fand sich hingegen häufig, - auch beim Mammarkarzinom AT 7 der C3H-Maus.

2. Beim SSK II ändert sich der histologische Gesamteindruck nach Bestrahlung nicht wesentlich. Im Tumorgewebe, das nach Bestrahlung etwas aufgelockert erscheint, finden sich nur vereinzelt Makrophagen. Dagegen enthält das umliegende Gewebe auffallend viele Makrophagen (s. Abb. 5).

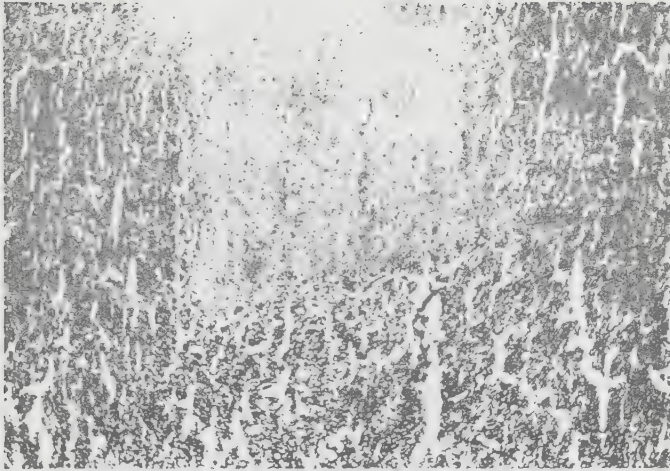


Abb. 6: Osteosarkom TVC der Hybriden C3H x 101, 8 h nach Bestrahlung mit einer lokalen Einzeldosis von 15 Gy. Histologische Methodik wie in Anmerkung zu Abb. 4. Gesamtvergrößerung ca. 65-fach.

Die Makrophagen sind nicht gleichmäßig über den Tumor verteilt. Es finden sich in großflächigen Zonen, die sich kaum vermischen, auf der einen Seite ca. 15 % Makrophagenanteil, auf der anderen ca. 2 % (gemessen mit der halbautomatischen Bildanalyse, s. 2.8.). Dies ist kein Effekt der Bestrahlung, der Kontrolltumor zeigte ein ähnliches histologisches Bild.

3. Im TVC stehen sich bereits vor Bestrahlung zwei etwa gleich große Bereiche gegenüber, die sich scharf voneinander abgrenzen und außerordentlich verschieden sind: Im einen sind 15 - 20 % der Fläche von Makrophagen bedeckt, im anderen weniger als 1 %. Nach Bestrahlung nimmt die scharfe Abgrenzung etwas ab, ebenso die großen Gegensätze im Makrophagengehalt (s. Abb. 6).

4. Vom AT 7 lassen sich in den ersten Tagen nach Bestrahlung nur Gefrierschnitte mäßiger Qualität herstellen (s. Abb. 7). Der Zellverband ist in diesem Zeitraum offenbar sehr lockergefügt. Es findet sich deutlich vermehrt Karyorhexis. Über den ganzen Tumor verteilt sind auch die zahlreichen Makrophagen, wobei sich entlang bindegewebiger Strukturen mögli-

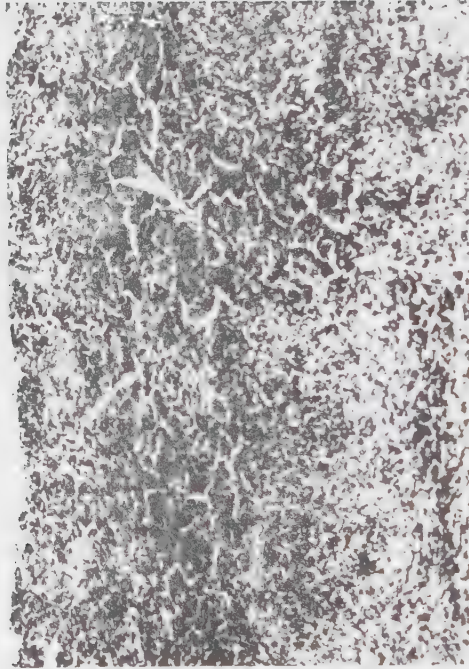


Abb. 7: Mammarkarzinom AT 7 der C3H-Maus, 4 h nach Bestrahlung mit einer lokalen Einzeldosis von 15 Gy. Histologische Methodik wie in Anmerkung zu Abb. 4. Gesamtvergrößerung ca. 100-fach.
Der AT 7 zeigte - besonders während der ersten Tage nach Bestrahlung - einen locker gefügten Zellverband. Für diesen Tumor wurde mit der halbautomatischen Bildanalyse (s. 2.8.) ein Makrophagenanteil von knapp 5 % ermittelt. Dieser Wert liegt im Bereich der Kontrolltumoren (s. 3.3.3.).

cherweise etwas mehr finden (s. Abb. 8). Ebenso wie beim SSK II zeigt das umliegende Bindegewebe oft Makrophagen. Gelegentlich erwecken zentrale Zonen des Tumors den Eindruck von größerer Makrophagendichte.

5. Nach der gewählten Vorbehandlung des Gewebes ist die Färbung so spezifisch, daß die Lysosomen von unbehandelten Tumorzellen nicht dargestellt werden. Nach Bestrahlung finden sich verschiedentlich runde enzymaktive Stellen, kleiner als Erythrozyten und über den ganzen Schnitt verstreut. Einige Tumorzellen zeigen geringe Enzymaktivität. In der Regel ist eine Verwechslung mit Makrophagen ausgeschlossen.

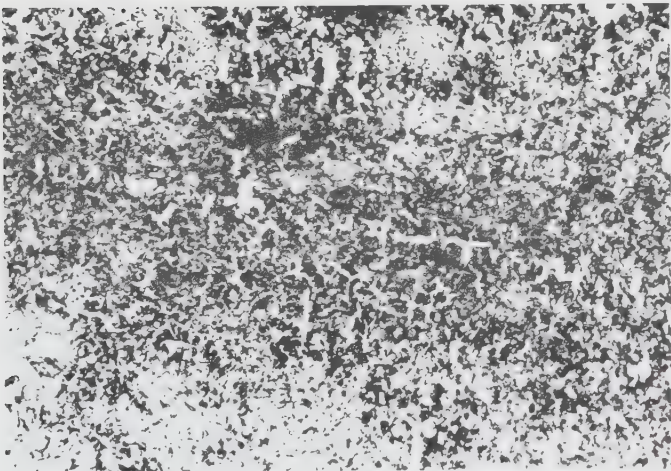


Abb. 8: Mammakarzinom AT 7 der C3H-Maus, 50 h nach Bestrahlung, andere Parameter wie in Anmerkung zu Abb. 7. Der Anteil der Makrophagen beträgt bei diesem Tumor knapp 10 % (halbautomatische Bildanalyse, s. 2.8.). Damit ist ein relatives Maximum erreicht (s. 3.3.3.).

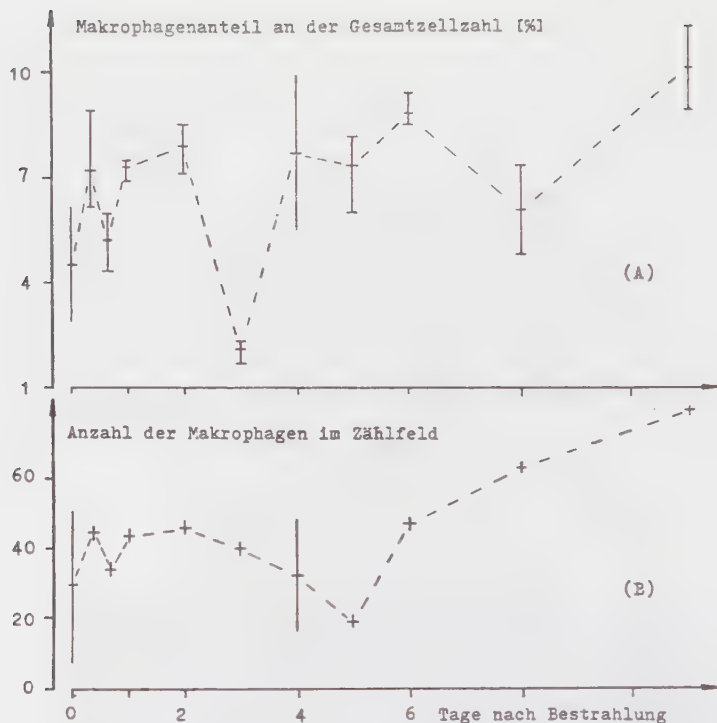


Abb.9: Makrophagengehalt des Fibrosarkoms SSK II nach Röntgenbestrahlung (lokale Einzeldosis von 15 Gy).

(A) Makrophagengehalt als Prozentsatz der Gesamtzellzahl

— = Spannweite zweier Werte, die an aufeinander senkrechtstehenden Zähl-Linien gewonnen wurden. Ebenfalls angegeben ist der Mittelwert.

+ = Standardabweichung und Mittelwert von 4 Tumoren. Zum Zeitpunkt 0 sind die unbehandelten Kontrollen eingetragen.

(B) Anzahl der Makrophagen in einem Zählfeld ($112500 \mu\text{m}^2$)

3.3. Enzymaktivität vor und nach Bestrahlung

3.3.1. Zahl der enzymaktiven Stellen

Die Anzahl der Makrophagen nimmt im SSK II nach Bestrahlung relativ zur Gesamtzellzahl zu (Abb. 9). Der Anstieg erreicht nach 11 Tagen etwa Faktor 2. Bei Wiedererlangen des Ausgangsgewichtes nach 7 Tagen besteht ein leichter Anstieg. Dieser ist jedoch nicht signifikant. Auffallend ist, daß mit den beiden verwendeten Methoden am 3. und 8. Tag nach Bestrahlung keine Korrelation festgestellt werden kann. Während die Werte

am Tag 8 unter Berücksichtigung der Streuung keiner weiteren Erklärung bedürfen, muß bei der Deutung der Werte am 3. Tag beachtet werden, daß die mittlere Fläche (s. Abb. 13) der Makrophagen am 3. Tag lediglich ca. 60 % der mittleren Fläche der Makrophagen am 2. Tag beträgt. Die Berechnung der mittleren Radien ergab: 5,1 μ m bzw. 4,1 μ m. Wie in 2.10. abgeleitet läßt sich allein aufgrund der Größenabnahme der Makrophagen vom 2. auf den 3. Tag nach Bestrahlung eine Abnahme des Meßwertes der zeichenmikroskopischen Auswertung auf etwa 5 % erwarten. Gemessen wurden 2,1 %.

Beim AT 7 steigt die Zahl der Makrophagen bezogen auf die gemessene Flächeneinheit innerhalb des 1. Tages auf etwa das

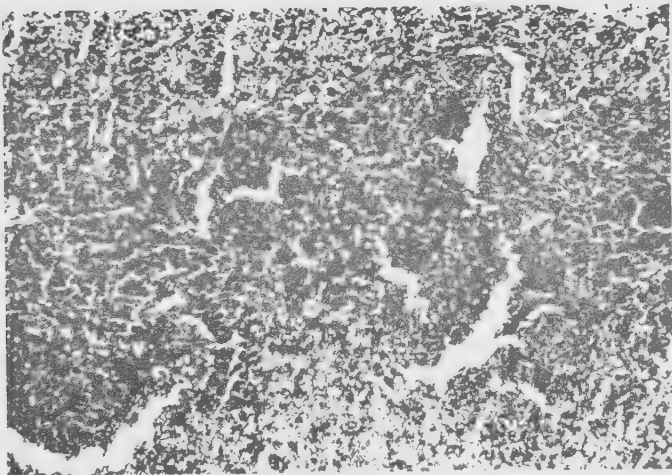


Abb. 10: Mammakarzinom AT 7 der C3H-Maus, 11 d nach Bestrahlung. Die mit Pararosanilin gefärbten Makrophagen (rote Punkte) sind sehr ungleichmäßig verteilt. Das Bild zeigt einen ca. 100-fach vergrößerten Ausschnitt eines 6 μ m dicken Gefrierschnittes, dessen zentraler Bezirk zu etwa 10 % von Makrophagen bedeckt ist, während der Flächenanteil der Makrophagen in den umgebenden Bereichen nur 2 % beträgt.

Doppelte an (s. Abb. 12). Vom 2. bis zum 8. Tag liegt sie etwas über dem Ausgangswert. Am 11. Tag zeigt sich ein recht inhomogenes Bild (s. Abb. 10). Innerhalb von zentralen Strängen finden sich auffallend viele Makrophagen, während die umliegenden Tumorbereiche in ihrem Makrophagengehalt deutlich unter dem Wert der Kontrollen liegen.

18 Tage nach Bestrahlung hatte der Tumor das Ausgangsgewicht bereits etwas überschritten. Der Makrophagengehalt lag beim 1,5-fachen des Wertes der Kontrollen.

3.3.2. Absolute enzymaktive Fläche

Wegen der nur peripher angeschnittenen Makrophagen (näheres s. 2.10.) liegen die Mittelwerte der absoluten Flächen unterhalb des Wertes, der sich aus dem Durchmesser errechnet. Außerdem ist anzunehmen, daß die Makrophagen nicht völlig mit Farbstoff ausgefüllt sind, nachdem sich die Lysosomen - und damit der Hauptteil der sauren Phosphatase - vor allem um den Kern gruppieren (15). Nach Bestrahlung zeigen die Mittelwerte der absoluten Flächen sowohl Zu- als auch Abnahmen, die keine Tendenz erkennen lassen (s. Abb. 13). Insgesamt scheinen die Makrophagen im AT 7 größer zu sein als im SSK II (s. Abb. 11). Dies ist jedoch nicht signifikant (Wilcoxon-Test).

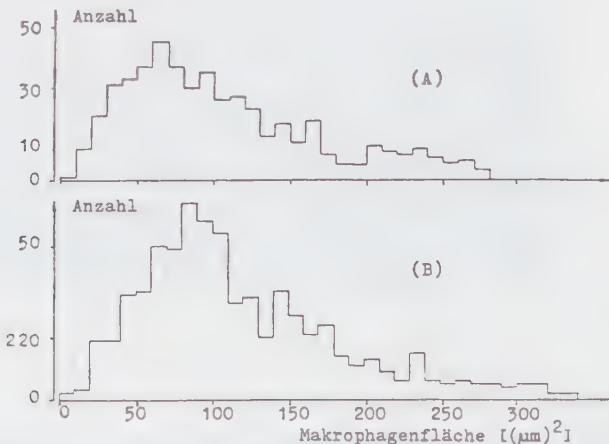


Abb. 11: Histogramm der gesamten Makrophagenflächen vor und nach Bestrahlung, gemessen mit halbautomatischer Bildanalyse im Fibrosarkom SSK II (A) und im Mammakarzinom AT 7 (B).

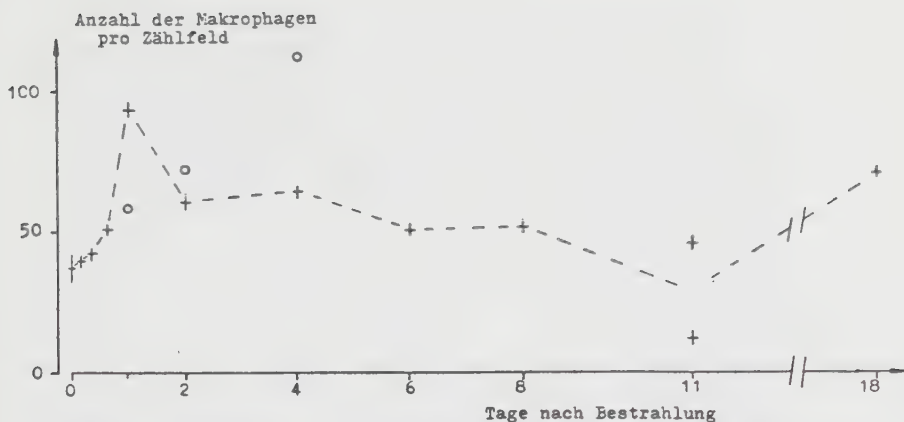


Abb. 12: Makrophagengehalt des Mammakrazinoms AT 7 nach Bestrahlung. Es wurde jeweils die Anzahl der Makrophagen in einem Zählfeld von $112\ 500\ (\mu\text{m})$ bestimmt. $\dagger$ = Standardabweichung und Mittelwert von 4 unbehandelten Kontrolltumoren. $\circ$ = der zu erwartende Meßwert für die Annahme, die Makrophagenanzahl im Tumor bliebe konstant, während der Tumor an Volumen verliert, wie in 2.10. ausgeführt.

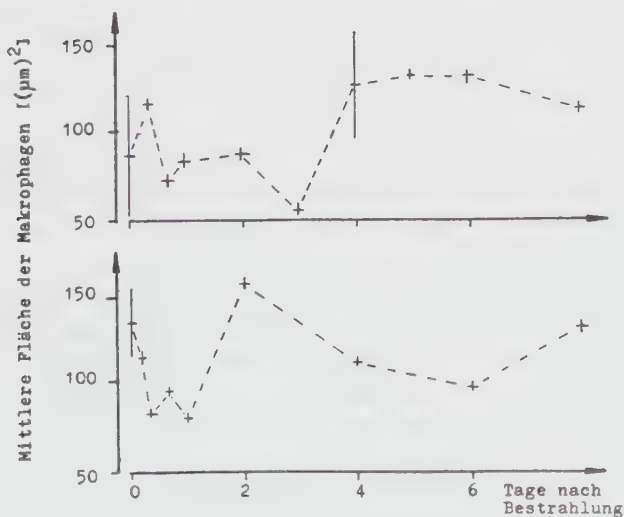


Abb. 13: Mittlere Fläche der Makrophagen im Fibrosarkom SSK II (A) und im Mammakarzinom AT 7 (B) nach Bestrahlung. $\dagger$ = Standardabweichung und Mittelwert von 4 Tumoren. Zum Zeitpunkt 0 sind die Werte der Kontrolltumoren eingetragen.

3.3.3. Relative enzymaktive Fläche

Die Gesamtfläche aller Makrophagen in Prozent der ausgewerteten Fläche als Maß für den Anteil der Makrophagen am Tumolvolumen zeigt beim SSK II nach 8 h einen deutlichen Anstieg (s. Abb. 14). Im weiteren Verlauf liegt die Kurve etwa im Bereich der Werte der unbehandelten Kontrollen. Die



Abb. 14: Anteil der Makrophagen an der Fläche von Gefrierschnitten des Fibrosarkoms SSK II nach Bestrahlung. Die Makrophagen wurden durch eine saure-Phosphatase-Färbung mit p-Rosanilin angefärbt. Mit halbautomatischer Bildanalyse wurde der prozentuale Anteil der Makrophagen einer Fläche von $112\,500\ (\mu\text{m})^2$ bestimmt.
 † = Standardabweichung und Mittelwert von 4 Tumoren. Zum Zeitpunkt 0 sind die unbehandelten Kontrollen eingetragen.

Standardabweichung am 4. Tag nach Bestrahlung beträgt mehr als das doppelte des entsprechenden Wertes vor Bestrahlung. Dies läßt sich auf einen einzelnen stark abweichenden Tumor (s. Abb. 5) zurückführen, der mit 0,7 % den niedrigsten aller Meßwerte stellte und dessen Gewicht nur etwa 60 % des Gewichts der anderen am 4. Tag nach Bestrahlung entnommenen Tumoren betrug. Mit dem erneuten Eintreten von Tumorstadium am 5./6. Tag nach Bestrahlung (s. Abb. 3) steigt der Makrophagengehalt der Tumoren deutlich an und zeigt im weiteren Verlauf eine steigende Tendenz. Im Vergleich zu den Kontrollen beträgt der Zuwachs an Makrophagen bei Wiedererlangung des Bestrahlungsgewichtes etwa Faktor 3 und bei Verdopplung des Ausgangsgewichtes etwa Faktor 4.

Beim AT 7 fanden wir 8 h nach Bestrahlung eine Abnahme des Makrophagenanteils (s. Abb. 15). Nach 2 Tagen erhielten wir

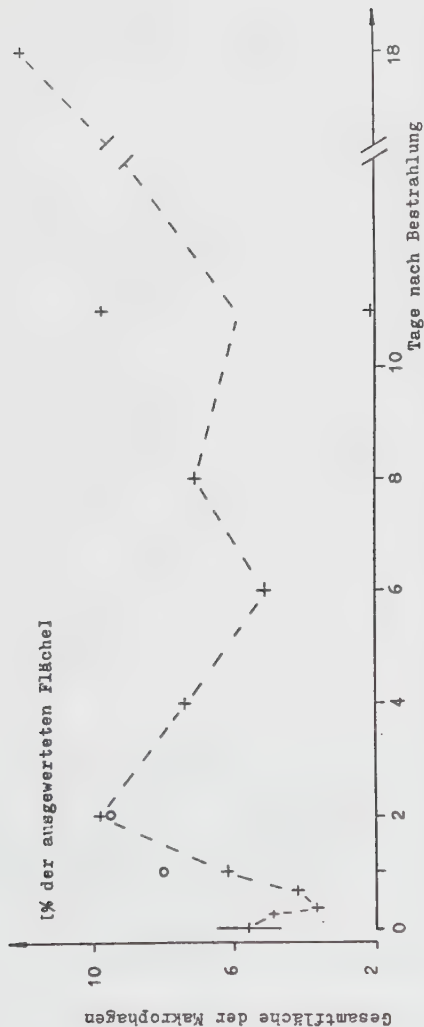


Abb. 15: Anteil der Makrophagen an der Fläche von Gefrierschnitten des Mammakarzinoms AT 7 nach Bestrahlung. Die Makrophagen wurden durch eine saure-Phosphatase-Färbung mit p-Rosanilin angefärbt. Mit halbautomatischer Bildanalyse wurde der prozentuale Anteil der Makrophagen einer Fläche von 112 500 (μm^2) bestimmt.
 + = Standardabweichung und Mittelwert von 4 unbehandelten Kontrolltumoren.
 o = der zu erwartende Meßwert für die Annahme, die Makrophagenanzahl im Tumor bliebe konstant, während der Tumor an Volumen verliert, wie in 2.10. ausgeführt.

ein deutliches Maximum, während sich der Makrophagengehalt an den restlichen Tagen um den Ausgangswert bewegte. Bei Wiedererlangung des Bestrahlungsgewichtes war der Anteil an Makrophagen auf etwa das Doppelte angewachsen. Für den 11. Tag wurden wegen der inhomogenen Verteilung der Makrophagen (s. Abb. 10) zwei Werte ermittelt.

3.3.4. Änderungen des Tumolvolumens und der Enzymaktivität im Vergleich

Wie in 2.10. ausgeführt, ist im histologischen Präparat auch dann ein Anstieg des Makrophagengehalts festzustellen, wenn die Anzahl der Makrophagen im Tumor während dessen Schrumpfungsprozesses nach Bestrahlung unverändert bleibt. Unter Verwendung von Formel (VI) (s. 2.10.) lassen sich Erwartungswerte bilden, die mit den Meßwerten in etwa übereinstimmen müßten, solange die Anzahl der Makrophagen im Tumor konstant bleibt. Beim Vergleich der entsprechenden Werte beim AT 7 zeigte sich, daß die Anzahl der Makrophagen (s. Abb. 12) am 1. Tag nach Bestrahlung über dem Erwartungswert liegt, während sie am 2. Tag mit dem berechneten Wert zusammenfällt. Im weiteren Verlauf liegen die Meßwerte so weit unter den Erwartungswerten, daß gefolgert werden kann: Die absolute Anzahl an Makrophagen nimmt einige Tage nach Bestrahlung mindestens um Faktor 2 ab. Auch der relative Flächenanteil der Makrophagen im AT 7 (s. Abb. 15) nimmt in den ersten Tagen nach Bestrahlung nur in dem Maß zu, in dem das Volumen des Tumors abnimmt, d.h. diese Größen verhalten sich etwa indirekt proportional zueinander. Zwar bleibt hier der Wert des ersten Tages etwas hinter den Berechnungen zurück, aber am 2. Tag fallen die Werte ebenfalls zusammen. Dann liegen sie wiederum weit auseinander, so daß auch mit dieser Meßmethode einige Tage nach Bestrahlung eine Abnahme des Makrophagengehalts um mindestens Faktor 2 zu beobachten ist.

Nachdem der Schrumpfungsprozeß beim SSK II nicht so stark ausgeprägt ist, spielt dieser Effekt keine Rolle. Allerdings ist aus den Meßwerten für die Phase des erneuten Tumorwachstums ersichtlich, daß die Anzahl der Makrophagen schneller zunimmt als das Tumolvolumen. Dies gilt, wenn

auch in geringerem Maß, ebenfalls für den AT 7.

3.4. Ergebnis der photometrischen Messung

Nachdem wie in 2.8. ausgeführt lediglich die Extinktion von den Präparaten eines Objektträgers miteinander verglichen werden kann (genau gleiche Färbebedingungen), wurden pro Objektträger 6 Schnitte aus dem selben Tumor gefärbt und deren Streuung (= Standardabweichung) bestimmt. Bei dem Vergleich der Werte von bestrahlten und unbestrahlten Tumoren war kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die 6 Schnitte bestehen aus 3 Paaren von je 2 direkt aufeinanderfolgenden Schnitten. Zwischen diesen Paaren waren jeweils ca. 60 μ m des Tumorgewebes verworfen worden. Die Extinktionen von zwei aufeinanderfolgenden Schnitten lagen nicht näher beieinander als die von 60 μ m entfernten Schnitten. Darin zeigt sich übereinstimmend mit unseren anderen Ergebnissen, daß die Makrophagen in etwa gleichmäßig über den Tumor verteilt sind. Daran ändert auch die Bestrahlung nichts wesentliches.

Eventuell könnte diese Methode weiter ausgebaut werden, indem man die jeweiligen Schwankungen der Färbung mit einem Referenzgewebe feststellt. Um einen verlässlichen Färbindex zu gewährleisten, müßte die Färbung des Gewebes möglichst homogen sein, z.B. käme Niere in Betracht. Dieses Organ zeigt mit der verwendeten sauren-Phosphatase-Färbung ein gleichmäßiges Rot. Auch die Zellkerne sind in etwa gleichmäßig verteilt. Eine andere Methode, eine enzymhistochemische Färbung quantitativ auszuwerten, wird von AIKMAN und WILLS (2) angegeben.

4. Diskussion

Die folgenden Aussagen gelten für die untersuchten transplantablen Tumorsysteme mit schwacher Immunogenität und wir schließen uns der Aussage Van FURTHs (63) an, daß Ergebnisse nicht ohne weiteres von einer Tumorart auf eine andere übertragen werden sollten. Wie eingangs erwähnt, scheint insbesondere die stark unterschiedliche Immunogenität verschiedener Tumoren entscheidenden Einfluß zu nehmen. Vielleicht sollte an dieser Stelle auch noch darauf hingewiesen werden, daß bei Mäusetumoren zwischen Makrophagengehalt und Immunogenität kein linearer Zusammenhang besteht (19;22) und die Metastasierungsbereitschaft nicht vom Makrophagengehalt abhängt (62).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, daß Zellen mit hoher Saurer-Phosphatase-Aktivität den wesentlichen Anteil des von verschiedenen Autoren (27; 56) festgestellten hohen Gehalts an Wirtszellen in bestrahlten Tumoren bilden. Nachdem bei Makrophagen verschiedene Untergruppen bekannt sind (21;28;36;42;48;58), die sich z.B. in ihrer Sauren-Phosphatase-Aktivität um den Faktor 15 unterscheiden (12), ist es vermutlich unmöglich, über eine Methode alle Makrophagen zu erfassen. Obwohl bislang keine Makrophagen ohne ausgeprägte Saure-Phosphatase-Aktivität beschrieben worden sind, ist es nicht ausgeschlossen, daß es Makrophagen gibt, die mit unserer Methode nicht erfaßt werden. So zeigen z.B. Monozyten nur 1/2 bis 1/8 der Enzymaktivität eines Gewebsmakrophagen (4).

Obwohl die von uns betrachteten Makrophagen im unbehandelten Tumor nur zwischen 2 und 5 % der Zellen stellen, während die von JUNG (27) betrachteten Wirtszellen ('host cells') etwa 55 % des Tumors ausmachen, stimmen unsere Ergebnisse darin überein, daß der Gehalt an 'host cells' bzw. Makrophagen erst nach 8 bis 10 Tagen bzw. 11 Tagen ein Maximum erreicht. Dies gilt für das Fibrosarkom SSK II und in der Tendenz auch für das Mammarkarzinom AT 7. Die unterschiedliche Methodik der Auswertung dürfte wohl bewirken, daß der von JUNG gemessene Anstieg um Faktor 2 größer ist als der von uns festgestellte.

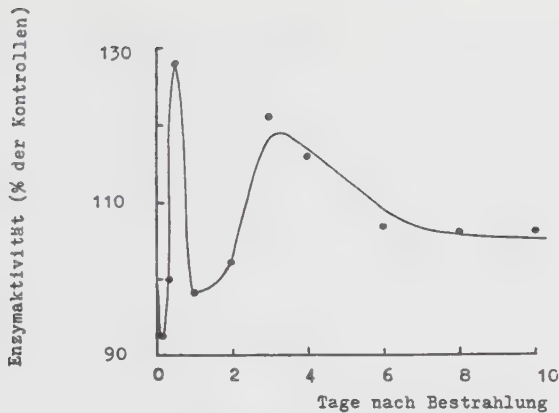


Abb. 16: Allgemeine Reaktion einiger lysosomaler Enzyme der Rattenleber nach Ganzkörperbestrahlung mit 7 - 8 Gy, wie sie von WATKINS (65) aus den Arbeiten mehrerer Autoren zusammengefaßt wurde.

WATKINS (65) abstrahierte 1975 aus den Arbeiten verschiedener Autoren eine allgemeine Antwort lysosomaler Enzymaktivität auf Ganz- und Teilkörperbestrahlung (s. Abb. 16). An Normalgeweben, wie Leber und Milz, aber auch an Tumoren wurden quantitative Aussagen über die lysosomale Enzymaktivität gemacht, die kurze Zeit nach Bestrahlung recht gut mit unseren Ergebnissen übereinstimmen. Nachdem die Anzahl und Größe der Lysosomen in Tumorzellen im Vergleich zu den Lysosomen in Makrophagen äußerst gering ist (26,25,45), ist es nicht verwunderlich, wenn bei alleiniger Betrachtung letzterer ein ähnliches Ergebnis resultiert. Vielleicht sollte bei der Beurteilung unserer Ergebnisse berücksichtigt werden, daß sich die Enzymaktivität in einem bestrahlten Gewebe aus zwei voneinander unabhängigen Reaktionen zusammensetzen könnte. Eine lokale lysosomale Antwort (z.B. erhöhte Membranpermeabilität) könnte durch die Zu- oder Abwanderung von lysosomenhaltigen Zellen (vor allem Makrophagen) überlagert sein. Damit wäre auch erklärt, warum in unseren Tumoren die Enzymaktivität auch nach Wiedererlangung des Ausgangsgewichts erhöht ist, während nach WATKINS (65) die Enzymaktivität auf das Ausgangsniveau zu-

rückkehrt. Natürlich variiert die angegebene Kurve (Abb. 10) in Abhängigkeit von der Dosis, dem jeweiligen Gewebe und dem betrachteten Enzym (z.B. saure Phosphatase, Muramidase, β -Galaktosidase). Außerdem muß einschränkend festgestellt werden, daß ein Teil der Untersucher zum Nachweis der sauren Phosphatase Pheryl- bzw. p-Nitrophenyl-Phosphat benutzte, was zu Verfälschungen durch unspezifische Reaktionen führen kann (65).

STEPHENS (55;56) fand 1980 bei einem Fibrosarkom (unbekannte Antigenität), daß ein Teil der Makrophagen in vitro Kolonien bilden kann. Diese Makrophagen-"progenitors", wie er sie nennt, können nicht wie andere Makrophagen durch Festhalten an einer Plastikfolie aus einer Zellsuspension entfernt werden. Nach Bestrahlung (25 Gy, ^{60}Co) des Fibrosarkoms nahmen die Makrophagen-progenitors um Faktor 100 ab. Nach 2 Tagen fanden sie sich wieder in der gleichen Größenordnung wie vor Bestrahlung, während bei Ganzkörperbestrahlung kein Wiederanstieg zu beobachten war. Möglicherweise sind die Makrophagen-progenitors des Autors mit Monozyten identisch. Es bleibt abzuwarten, ob diese Beobachtung sich bei anderen Tumoren bestätigen läßt. Beim gegenwärtigen Stand der Dinge scheint es jedenfalls, daß Vorläufer von Makrophagen nach Bestrahlung in den Tumor gelangen. Das könnte eine Erklärung dafür sein, daß der Volumenverlust nach Bestrahlung nicht mit dem Makrophagengehalt vor Bestrahlung korreliert (37).

Bekanntlich enthalten Tumoren noch andere saure-Phosphatase-positive Zellen (36;39;52;60;67), nämlich Fibrozyten und Granulozyten. Im Sinn der Bildung von "Narbgewebe" nach Bestrahlung kommen Fibrozyten in Frage. Die Form der saure-Phosphatase-positiven Zellen im SSK II ist oft spindelförmig, was zu Fibrozyten passen würde. Eine aktive Rolle nach Bestrahlung könnten die Granulozyten, auch Mikrophagen genannt, übernehmen. Im Gewebe unserer Tumoren fand sich nur ein verschwindend geringer Anteil von Granulozyten mit Saurer-Phosphatase-Aktivität. Anhand ihrer Kernmorphologie sind sie leicht von Makrophagen zu unterscheiden. Sie dürften das Ergebnis unserer Messung kaum be-

einflußt haben, denn ihre enzymaktive Fläche ist verhältnismäßig klein. Nachdem ihr Zellumsatz allgemein sehr hoch ist (4;34), scheint eine Beteiligung an den Schrumpfungsprozessen nach Bestrahlung nicht ausgeschlossen.

Es erscheint uns wahrscheinlich, daß die Bestrahlung die (noch ungeklärte) Wechselwirkung zwischen Makrophagen und (überlebenden) Tumorzellen nur gering beeinflusst. Wenn der Makrophagengehalt von Tumoren während rascher Wachstumsphasen konstant bleibt (16;39), scheint dies auch für Phasen der Tumorschrumpfung möglich. So ist z.B. der Makrophagengehalt bei BCG-induziertem Volumenverlust bzw. Wachstumsstopp eines Tumors unverändert (37;40). Es muß betont werden, daß der Makrophagengehalt nichts über den Umsatz dieser Zellen aussagt. BUGELSKI (8) entwickelte 1983 eine Methode, die eine quantitative Aussage über Makrophagen ermöglicht, die von der Blutbahn ins Gewebe eingewandert sind. Es wäre interessant, mit dieser Methode folgende hypothetische Erklärung des ansteigenden Makrophagengehalts bei wiedereinsetzendem Tumorwachstum zu untersuchen: Makrophagen verlassen mit phagozytiertem Material das Gewebe und werden fortlaufend durch Monozyten ersetzt. Nachdem nach Bestrahlung die Zahl der letal geschädigten Tumorzellen exponentiell abnimmt (27), kommt es zu einer raschen Abnahme der Phagozytose und die Makrophagen wandern nicht mehr ab. Es kommt zu einem Reboundeffekt, weil entweder die (unbekannten) Monozyten anlockenden Mechanismen weiterbestehen oder/und bereits eingewanderte Monozyten sich erst differenzieren, wodurch sie in unserer Färbung sichtbar wurden. Dazu würde passen, daß die absolute Anzahl der Makrophagen zuerst abnimmt, also wie auch immer ein Nettotransport stattfindet. Nachdem Makrophagen ihre morphologische und funktionelle Integrität bei Strahlendosen bis zu 50 Gy bewahren (2;13), ist mit ihrem strahlenbedingten Zelltod nicht zu rechnen.

Bereits 1967 wurden von BRANDES et al. (6) die Lysosomen von Tumorzellen elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Lysosomen über ihre Saure-Phosphatase-Aktivität enzymhistochemisch angefärbt. Nach Bestrahlung nahmen die zuvor

spärlich vorhandenen, kleinen Lysosomen an Anzahl und Größe zu. Dies wurde damals in kausalem Zusammenhang mit dem Absterben bestrahlter Zellen gesehen, während sich heute die Frage stellt, inwieweit und wie schnell Tumorzellen die Überreste abgestorbener Zellen phagozytieren können. Wie KERR et al. 1980 (30) beschrieben, können absterbende Zellen innerhalb von Minuten in "apoptotic bodies" zerfallen, die von umliegenden Zellen, sowohl malignen Zellen wie auch Makrophagen, aufgenommen werden. Der Volumenverlust des Gewebes müßte dabei der Menge des freigesetzten Zellwassers entsprechen. Jedoch allein mit diesem Vorgang ist ein Volumenverlust von etwa 75 % des Ausgangswertes, wie er beim AT 7 auftritt, kaum zu erklären, da tierisches Gewebe zu weniger als 70 % aus Wasser besteht. Deshalb müßte nach der in dieser Arbeit gezeigten Abnahme der absoluten Makrophagenzahl noch ein weiterer Umsatz von Zellen stattfinden, um einen Volumenverlust dieses Ausmaßes zu bewirken. Diese Zellen könnten Makrophagen sein. Bislang bestehen keine Arbeiten über den "turn over" des Makrophagenbestandes von Tumoren nach Bestrahlung. Die 1983 von BUGELSKI et al. (8) entwickelte Methode könnte solche Arbeiten ermöglichen. Erst dann wird sich das Ausmaß der Beteiligung der Makrophagen an der Tumorregression zeigen.

5. Zusammenfassung

Die Möglichkeit, daß Makrophagen eine Rolle bei der Schrumpfung von Tumoren nach Bestrahlung spielen, führt zu der Frage, ob Veränderungen des Makrophagengehalts von Tumoren nach Bestrahlung festgestellt werden können. Zwei transplantable Tumorsysteme der C3H-Maus, ein Fibrosarkom (SSK II) und ein Mammakarzinom (AT 7), wurden untersucht und die Saure-Phosphatase-Aktivität in den Makrophagen mit Hilfe einer enzymhistochemischen Methode dargestellt. Wir fanden:

1. Der Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl erfährt alles in allem keine größere Änderung; bei Wiedererlangung des Ausgangsgewichts ist er erhöht (etwa um den Faktor 2 bis 3), mit zunehmender Tendenz.
2. In den ersten beiden Tagen nach Bestrahlung reagieren die beiden Tumoren bezüglich ihres Makrophagengehalts unterschiedlich.
3. Beim nicht schrumpfenden SSK II findet sich nach 8 h für kurze Zeit ein Anstieg um Faktor 2.
4. Beim schnell schrumpfenden AT 7 steigt der Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl in den ersten beiden Tagen nach Bestrahlung etwa in dem Maß, wie der Tumor an Volumen verliert, so daß die Anzahl der Makrophagen im Tumor ungefähr gleich blieb.
5. Nachdem der Anteil der Makrophagen im weiteren Verlauf im Bereich des Kontrollwertes vor Bestrahlung liegt, kann beim AT 7 davon ausgegangen werden, daß infolge der Schrumpfung die Anzahl der Makrophagen im Tumor nach Bestrahlung nur etwa 30 % der Anzahl vor Bestrahlung beträgt.
6. Die Makrophagen sind über den ganzen Tumor verstreut, wobei bindegewebige Strukturen in und am Tumor etwas dichter besetzt sind.
7. In einem dritten, bislang nur teilweise untersuchten Tumor, dem Osteosarkom TVC, sind die Makrophagen nicht gleichmäßig verteilt. Es finden sich großflächige Bereiche mit hohem Makrophagengehalt (15-20%); ebenso gibt es große Bereiche, die keine Makrophagen enthalten.

Literaturverzeichnis

- 1 ADAMS, D.C. and SNYDERMAN, R.: Do macrophages destroy nascent tumors? *JNCI* 62/6 (1979)
- 2 AIKMAN, A.A. and WILLS, E.D.: Studies on lysosomes after irradiation: I. A quantitative histochemical method for the study of lysosomal membrane permeability and acid phosphatase activity. II. Lysosomal membrane permeability and acid phosphatase activity of lymphoid and other tissues after whole-body irradiation. *Radiat.Res.* 57, 403-429 (1974)
- 3 ALLISON, A.C.: Lysosomes and cancer. In: *Lysosomes in biology and pathology*, vol.II. Ed.: DINGLE, J.T. and FELL, H.B. North-Holland publishing company, Amsterdam, London. 190-203 (1969)
- 4 BAINTON, D.F., NICHOLS, B.A. and FARQUHAR, M.G.: Primary lysosomes of blood leukocytes. In: *Lysosomes in biology and pathology*, vol.V. Ed.: DINGLE, J.T. and DEAN, R.T.: North-Holland publishing company, Amsterdam, London. 1-49 (1976)
- 5 BOTTAZZI, B., POLENTARUTTI, N., BALSARI, A., BORASCHI, D., GHEZZI, P., SALMONA, M., and MANTOVANI, A.: Chemotactic activity for mononuclear phagocytes of culture supernatants from murine and human tumor cells: evidence for a role in the regulation of the macrophage content of neoplastic tissues. *Int.J.Cancer*: 31, 55-63 (1983)
- 6 BRANDES, D., SLOAN, K.W., ANTON E. and BLCEDORN F.: The effect of X-irradiation on the lysosomes of mouse mammary gland carcinomas. *Cancer Res.* 27, 731-746 (1967)
- 7 BRONSTEIN, I.N. und SEMENDJAJEW, K.A.: Taschenbuch der Mathematik. Hrsg.: GROSCHE, G. und ZIEGLER, V. Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt/Main, 19.Aufl. 1980
- 8 BUGELSKI, P.J., KIRSH, R.L. and POSTE, G.: New histochemical method for measuring intratumoral macrophages and macrophage recruitment into experimental metastases. *Cancer Res.* 43, 5493-5501, (1983)
- 9 BUSCHMANN, J.P., Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg. Jahresbericht 1982
- 10 CAMERON, D.J. and CHURCHILL, W.H.: Cytotoxicity of human macrophages for tumor cells. *J.Clin.Invest.* 63, 977-984 (1979)
- 11 COHN, Z.A. and FEDORKO, M.E.: The formation and fate of lysosomes. In: *Lysosomes in biology and pathology*, vol.I Ed.: DINGLE, J.T. and FELL, H.B. North-Holland publishing company, Amsterdam, London. 43-63 (1969)

- 12 COHN, Z.A. and WIENER, E.: The particulate hydrolases of Macrophages. I. Comparative enzymology, isolation and properties. II: Biochemical and morphological response to particle ingestion. *J.Exp.Med.* 118, 991-1019 (1963)
- 13 DEN OTTER, W., EVANS, R. and ALEXANDER, P.: Differentiation of immunologically specific cytotoxic macrophages into two types on the basis of radiosensitivity. *Transplantation*, 18, 421 (1974)
- 14 ECCLES, S.A.: Macrophages and cancer. In: *Immunological aspects of cancer*. Ed.: CASTRO, J.E.; Lancaster, England: MTP Press. 123-154 (1978)
- 15 EDER, M. und GEDIGK, P. (Hrsg.): *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 30.Aufl. (1977)
- 16 EVANS, R.: Macrophages in syngeneic animal tumors. *Transplantation*, 14, 468-473 (1972)
- 17 EVANS, R.: Effect of x-irradiation on host-cell infiltration and growth of a murine fibrosarcoma. *Br.J.Cancer* 35, 557-565 (1977)
- 18 EVANS, R.: Macrophage accumulation in primary and transplanted tumors growing in C5-deficient B10.D2/oSn Mice. *Int.J.Cancer* 26, 227-229 (1980)
- 19 EVANS, R. and LAWLER, E.M.: Macrophage content and immunogenicity of C57BL/6J and BALB/cByJ methylcholanthrene-induced sarcomas. *Int.J.Cancer* 26, 831-835 (1980)
- 20 FAUVE, R.M., HEVIN, M.B. and DAUGE, M.C.: Inflammation and activation of macrophages. In: *The Macrophage and cancer*. Ed.: JAMES, K., MCBRIDE, B. and STUART, A. Econoprint, Edinburgh. 258-264 (1977)
- 21 FINK, M.A.: *The macrophage in neoplasia*. Academic Press, New York (1976)
- 22 FOGLER, W.E. and FIDLER, I.J.: Role of macrophages in host resistance against tumors. In: *Basic and clinical tumor immunology*. Ed: HEBERMAN, R.B., Martinus Nijhoff Publishers, Boston. (1983)
- 23 GREENSPAN, J.S., MELAMED, M.R. and RAERSE, A.G.E.: Early histochemical changes in irradiated salivary glands and lymph-nodes of the rat. *J.Pathol.Bacteriol.* 88, 439-450 (1964)
- 24 GULLINO, P.M.: Extracellular compartments of solid tumors. In: *Cancer*, vol. 3. Ed.: BECKER, F.F., Plenum Press, New York. 327 (1975)
- 25 HARRIS, J.W.: Effects of ionizing radiation on lysosomes

and other intracellular membranes. *Biol.Med.Phys.* 13, 273-287 (1970)

- 26 JEANNIN, J.-F., OLSSON, N.O. and MARTIN, F.: Liposome induction or enhancement of macrophage-mediated cancer cell lysis. *Int.J.Cancer* 31, 75-80 (1983)
- 27 JUNG, H., BECK, H.P., BRAMMER, I. and ZYWIETZ, F.: De-population and repopulation of the R1H rhabdomyosarcoma of the rat after X-irradiation. *Europ.J.Cancer* 17, 375-386 (1981)
- 28 KAVAI, M.: Functional heterogeneity of macrophages. *Immunology*, 36, 729-732 (1979)
- 29 KELLER, R.: Promotion of tumor growth in vivo by anti-macrophage agents. *J.Natl.Cancer Inst.* 57, 1355-1361 (1976)
- 30 KERR, J.F.R. and SEARLE, J.: Apoptosis: Its nature and kinetic role. In: *Radiation biology in cancer research*. Ed.: MEYN, R.E. and WITHERS, E.R., Raven Press, New York 385-395 (1980)
- 31 KUMMERMEHR, J., Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg. Nicht veröffentlichte Arbeiten.
- 32 LAUDER, I., AHERNE, W., STEWARD, J. and SAINSBURY, R.: Macrophage infiltration of breast tumors : a prospective study. *J.Clin.Path.* 30, 563-568 (1977)
- 33 LAWSON, A.D.G. and STEVENSON, G.T.: Macrophages induce antibody-dependent cytostasis but not lysis in guinea pig leukaemic cells. *Br.J.Cancer* 48, 227-237 (1983)
- 34 LEONHARDT, H.: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme Verlag, Stuttgart, 5.Aufl. (1977)
- 35 LOJDA, Z., GOSSRAU, R. und SCHIEBLER, T.H.: *Enzymhistochemische Methoden*. Springer Verlag, Berlin (1976)
- 36 MATHE, G., FLORENTIN I. and SIMMLER, M.-C. (Eds.): *Lymphocytes, macrophages and cancer*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1976)
- 37 MENDIONDO, C., SUIT, H., PHIL, D. and FIXLER, H.: Lysozyme levels and macrophage content of tumor tissue in C3H mice bearing fibrosarcoma transplants treated by radiation and *corynebacterium parvum*. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 4, 829-834 (1979)
- 38 MEURET, G., SCHMITT, E., HAGEDORN, M. and KUHN, A.: Monocyte production in malignant diseases. In: *The macrophage and cancer*. Ed.: JAMES, K., MCBRIDE, B. and STUART, A., Econoprint, Edinburgh. 258-264 (1977)
- 39 MOORE, K. and MOORE, M.: Intra-tumor host cells of

transplanted rat neoplasms of different immunogenicity. *Int.J.Cancer* 19, 803-813 (1977)

- 40 MOORE, K. and McBRIDE, W.H.: Enhanced Fc receptor expression by a sub-population of murine intra-tumor macrophages following intravenous corynebacterium parvum therapy. *Br.J.Cancer* 47, 797-802 (1983)
- 41 NASH, J.R.G., PRICE, J.E. and TARIN, D.: Macrophage content and colony-forming potential in mouse mammary carcinomas. *Br.J.Cancer* 43, 478-485 (1981)
- 42 NORTH, R.J.: The concept of the activated macrophage. *J.Immunol.* 121, 806-809 (1978)
- 43 OTU, A.A., RUSSELL, R.J., WILKINSON, P.C. and WHITE, R. G.: Depression of mononuclear phagocyte function in C57B1 mice bearing lewis lung carcinoma. *Br.J.Cancer* 36 330 (1977)
- 44 PARIS, J.E., BRANDES, D. and ANTON, E.: Distribution and properties of lysosomal enzymes in untreated and in irradiated mouse mammary gland carcinomas. *J.Natl.Cancer Inst.* 42, 383-398 (1969)
- 45 PARIS, J.E. and BRANDES, D.: Effect of X-irradiation on the functional status of lysosomal enzymes of mouse mammary gland carcinomas. *Cancer Res.* 31, 392-401 (1971)
- 46 PIKE, M.C. and SNYDERMAN, R.: Depression of macrophage functions by a factor produced by neoplasms: a mechanism for abrogation of immune surveillance. *J.Immunol.* 117, 1243-1249 (1976)
- 47 PROSS, H.F. and KERBEL, R.S.: An assessment of intra-tumor phagocytic and surface marker-bearing cells in a series of autochthonous and early passaged chemically induced murine sarcomas. *J.Natl.Cancer Inst.* 57, 1157-1167 (1976)
- 48 RADZUN, H.J., PARWARESCH, M.R., SUNDSTRÖM, C., NILSSON, K. and EISSNER, M.: Monocytic origin of the human hematopoietic cell line U-937 and its convertibility to macrophages evidenced by isoenzyme mapping. *Int.J.Cancer* 31, 181-186 (1983)
- 49 RENE, A.A., DARDEN, J.H. and PARKER, J.L.: Radiation induced ultrastructural and biochemical changes in lysosomes. *Lab.Invest.* 25, 230-239 (1971)
- 50 ROTH, J.S. and EICHEL, H.J.: The effect of total body X-irradiation on the distribution of ribonuclease activity in subcellular fractions of rat spleen. *Rad.Res.* 11, 572-577 (1959)
- 51 SELVARAJ, R.J. and SBARRA, A.J.: Role of the phagocyte

in host-parasite interactions. VIII. Effect of whole-body X-irradiation on nicotinamides, lysosomal enzymes, and bactericidal activities of leukocytes during macrocytosis. *J.Bacteriol.* 94, 149-156 (1967)

- 52 SIEMANN, D.W., LORD, E.M., KENG, P.C. and WHEELER, K.T.: Cell subpopulations dispersed from solid tumors and separated by centrifugal elutriation. *Br.J.Cancer* 44, 100-108 (1981)
- 53 SPECTOR, W.G.: Macrophage turnover and traffic: a review. In: *The Macrophage and cancer*. Ed.: JAMES, K., McBRIE, B. and STUART, A., Econoprint, Edinburgh. 15-18 (1977)
- 54 SNYDERMAN, R., MEADOWS, L., HOLDER, W. and WELLS, J.R.: Abnormal monocyte chemotaxis in patients with breast cancer: evidence for a tumor mediated effect. *J.Natl.Cancer Inst.* 60, 737-749 (1978)
- 55 STEPHENS, T.C. and STEEL, G.G.: Regeneration of tumors after cytotoxic treatment. In: *Radiation Biology in cancer research*. Eds.: MEYN, R.E. and WITHERS, H.R., Raven Press, New York, 385-395 (1980)
- 56 STEPHENS, T.C. and PEACOCK, J.H.: Clonogenic host cells and the assessment of tumor cell survival in vitro. *Br.J.Cancer Suppl.* IV, 256 (1980)
- 57 STEPHENS, T.C., CURRIE, G.A. and PEACOCK, J.H.: Repopulation of γ -irradiated Lewis lung carcinoma by malignant cells and host macrophage progenitors. *Br.J.Cancer* 38, 573-582 (1978)
- 58 STUART, A.E.: The heterogeneity of macrophages: a review. In: *The macrophage and cancer*. Ed.: JAMES, K., McBRIE, B. and STUART, A., Econoprint, Edinburgh. 1-14 (1977)
- 59 SUIT, H.D. and WALKER, A.M.: Assessment of the response of tumours to radiation: clinical and experimental studies. *Br.J.Cancer* 41, Suppl.*IV*, 1 1-10 (1980)
- 60 SVENNEVIG, J.-I. and SVAAR, H.: Content and distribution of macrophages and lymphocytes in solid malignant human tumors. *Int.J.Cancer* 24, 754-758 (1979)
- 61 TANNOCK, I.F., SUIT, H.D. and MARSHALL, N.: Vitamin A and the radiation response of experimental tumors: an immune-mediated effect. *J.Natl.Cancer Inst.* 48, 731-741, (1972)
- 62 TALMADGE, J.E., KEY, M. and FIDLER, I.J.: Macrophage content of metastatic and nonmetastatic rodent neoplasms. *J.Immun.* 126, 2245-2248 (1981)

- 63 VAN FURTH, R.: Concluding remarks: unsolved problems concerning the interaction between macrophages and tumor cells. In: The Macrophage and cancer. Ed.: JAMES, K., McBRIDE, B. and STUART, A., Econoprint, Edinburgh. 445-448 (1977)
- 64 VAUPEL, P. und MÜLLER-KLIESER, W.: Interstitieller Raum und Mikromilieu in malignen Tumoren. 6.Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation e.V., München, 26./27. Nov. 1982
- 65 WATKINS, D.K.: Lysosomes and radiation injury. In: Lysosomes in biology and pathology, vol.IV. Ed.: DINGLE, J. T. and DEAN, R.T., North-Holland publishing company, Amsterdam, London. 147-166 (1975)
- 66 WOOD, G.W. and GOLLAHON, K.A.: T-lymphocytes and macrophages in primary murine fibrosarkomas at different stages in their progression. Cancer Res. 38, 1857-1865, (1978)
- 67 WOODRUFF, M.F.A.: Review: Cellular heterogeneity in tumors. Br.J.Cancer 47, 589-594 (1983)

Lebenslauf

27.01.1958 geboren in Buching (bei Füssen)
1964 - 1965 Besuch der Grundschule in Marzoll
1965 - 1968 Grundschule, Bad Reichenhall
1968 - 1969 Hauptschule, Bad Reichenhall
1969 - 1978 Besuch des Mathematisch-naturwissen-
 schaftlichen Gymnasiums in Bad Reichen-
 hall
1978 - 1979 Wehrdienst
1979 - 1985 Studium der Medizin an der Ludwig Maximili-
 ans-Universität zu München
Okt. 1982 Beginn der experimentellen Arbeiten am
 Strahlenbiologischen Institut
WS 83/84 Auslandssemester in England
Abschluß des Studiums voraussichtlich Okt./Nov. 1985

